Aus dem Institut für Pharmazie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. Hans Möhrle

Eine neue Methode zur Bestimmung der Steroidhydroxylierung mit Hilfe von Tritium-markierten Steroiden

In vivo und in vitro Untersuchungen mit Östrogenen und einem Gestagen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jutta Glasberger, geb. Hönicke
aus Potsdam-Babelsberg

1976

Aus dem Institut für Pharmazie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. Hans Möhrle

Eine neue Methode zur Bestimmung der Steroidhydroxylierung mit Hilfe von Tritium-markierten Steroiden

In vivo und in vitro Untersuchungen mit Östrogenen und einem Gestagen

UNIV. LIBRARY BRL

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jutta Glasberger, geb. Hönicke

aus Potsdam-Babelsberg

Referent: Prof. Dr. M. Wenzel
Koreferent: Prof. Dr. J. Hammerstein

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11. Mai 1976

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einführung und Problemstellung	1
2.	Einleitender Überblick	2
3.	Ist die HTO-Bildung aus Tritium-markierten Steroiden ein Maß für die Hydroxylierung?	6
3.1	Prinzip der Beweisführung	6
3.2	Isolierung und Identifizierung von 6-Hydroxyöstradiol	7
3.2.1	Punktdrucker-Auswertung im Vergleich zur Autoradiographie	11
3.3	Parallelität der Östradiol-Hydroxylierung gemessen mit Östradiol-6,7-T, Östradiol-2,4,6,7-T und Östradiol-4-^{14}C	14
3.3.1	Inkubationsversuche: aerob, anaerob und unter reinem Sauerstoff	14
3.3.2	Inkubationsversuche unter Zusatz von Metopiron, Cyproteronacetat und Phenobarbital-Na (aerob)	18
3.4	Ausschluß der chemischen Labilisierung des Tritiums	19
4.	Charakteristika der Hydroxylierungsreaktion	20
4.1	Zeitabhängigkeit	21
4.2	pH-Abhängigkeit	21
4.3	Konzentrationsabhängigkeit mit und ohne Hemmstoffzusatz (Bestimmung der K_m-Werte und Inhibitorkonstanten)	24
4.3.1	Östradiol-6,7-T	27
4.3.2	Östradiol-2,4,6,7-T	27
4.3.3	Äthinylöstradiol-6,7-T	31
4.3.4	Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T	31
4.3.5	Die Hydroxylierungshemmstoffe Metopiron und Cyproteronacetat	32
5.	Hydroxylierungen in vivo, mit und ohne Barbituratvorbehandlung	33

Seite

5.1 Prinzip der in vivo Messung 33
5.2 Äthinylöstradiol-6,7-T 37
5.3 Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T 39
5.4 Östradiol-2,4,6,7-T 39

6. Diskussion 44

7. Zusammenfassung 53

8. Material und Methodik 56

8.1 Material 56
8.2 Methodik 57

9. Literaturverzeichnis 61

1. Einführung und Problemstellung

Die Sexualhormone gehören wie die Nebennierenrindenhormone zu den Steroiden.
Bei den männlichen Sexualhormonen stellt das Testosteron den wichtigsten Vertreter dar.
Im weiblichen Organismus werden zwei physiologisch verschiedene Keimdrüsenhormone gebildet, die Östrogene (wichtigster Vertreter: Östradiol) und die Gestagene (wichtigster Vertreter: Progesteron).
Die Inaktivierung und Ausscheidung der Sexualhormone ist, wie bei allen Hormonen, ein unerläßliches Glied in der Kette hormonaler Regulation.
Die Hydroxylierung der Steroide stellt einen solchen Inaktivierungsschritt dar. Ihr liegt folgende allgemeine Reaktionsgleichung zugrunde:

$$\text{Steroid} + \text{NADPH} + O_2 + H^+ \xrightarrow{\text{Hydroxylasen}} \text{Hydroxy-Steroid} + \text{NADP}^+ + \text{HTO}$$

Die Menge an hydroxyliertem Steroid kann unter Zugrundelegung dieser Gleichung durch Messung des entstandenen HTO ermittelt werden (67). Diese Messung erfolgt entweder in vitro durch HTO-Destillation nach vorangegangener Inkubation oder in vivo durch Anwendung der Radiospirometrie, einer eleganten, unter eigener Mitarbeit für diesen Zweck erprobten Methode (68), die ursprünglich von Wenzel und Mitarbeiter (66) zur Bestimmung der Östradiol-Oxydation entwickelt wurde.
In der vorliegenden Arbeit wird der Beweis geführt, daß das bei den Versuchen jeweils gemessene HTO tatsächlich bei der Hydroxylierungsreaktion entstand. Daneben wird die Enzymabhängigkeit der Reaktion nachgewiesen.

Da die Hydroxylierung einer Inaktivierung des betreffenden Steroides gleichkommt, lag ein besonderes Interesse vor, bei den beiden gebräuchlichsten Komponenten

von Ovulationshemmern, Äthinylöstradiol (östrogene Komponente) und Äthinyl-nor-testosteron-acetat (gestagene Komponente), über deren Metabolismus bisher wenig bekannt ist, das Ausmaß der induzierbaren Hydroxylierung festzustellen. Als Enzyminduktor diente das Natriumsalz der Phenyläthylbarbitursäure.
Neben der Induktion der Hydroxylierungsreaktion wurde auch deren Hemmung durch Cyproteronacetat und Metopiron eingehend untersucht.

2. Einleitender Überblick

Die Inaktivierung von Hormonen ist ein wichtiger Schritt im intermediären Stoffwechsel, ohne die eine Regulationswirkung nicht denkbar wäre.
Die Sexualhormone werden hauptsächlich in der Leber metabolisiert. Dort finden sich, zum Teil in der löslichen Plasmafraktion, zum Teil in den mikrosomalen Strukturen, Enzymsysteme mit großer Stereospezifität und oft auch hoher Substratspezifität (44, 45, 46).
Für die Androgene sei dabei besonders die enzymatische Reduktion der Doppelbindung des Ringes A erwähnt (23, 24, 62), für Androgene und Östrogene die 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die 17-Oxosteroide und 17β-Hydroxysteroide ineinander umwandelt (16).
Die 17β-Östradiol-16α-Hydroxylase hydroxyliert Östradiol zu Östriol (52) und die 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase überführt als bevorzugtes Substrat 16α-Hydroxy-Östron zu Östriol.
Geschlechtspezifische Unterschiede im Abbau von Steroidhormonen lassen sich ebenfalls nachweisen (73, 63, 54, 58).
Neben dem eigentlichen Metabolismus findet in der Leber die Bildung von Konjugaten, wie Steroid-Sulfaten und -Glucuronaten, statt, deren Ausscheidung durch die Nieren erfolgt.

In vitro Versuche zeigten, daß in der Mikrosomenfraktion von Rattenlebern ein Enzymsystem enthalten ist, das Östrogene in Gegenwart von Sauerstoff und NADPH rasch metabolisiert (26). Die Metaboliten erwiesen sich als Hydroxylierungsprodukte. Bisher wurden Hydroxylierungen von Östrogenen an folgenden Positionen gefunden: 2 (8, 27, 36, 39), 4 (25), 6α, 6β (6, 7, 8, 9, 49), 7α (8), 10 β(28, 29), 15α (34, 8), 16 α, 16 β(52, 8).
Lebermikrosomen enthalten neben den hydroxylierenden auch dehydrierende Aktivitäten (9). Somit sind für die meisten der in der Leber gebildeten Hydroxy-Steroide die entsprechenden Dehydrierungsprodukte bekannt.
Nach in vivo Versuchen von Fishman und Mitarbeitern (14) kann das Östron als das erste Inaktivierungsprodukt des Östradiols aufgefaßt werden.
Engel und Mitarbeiter (13) machten die Beobachtung, daß auch methoxylierte phenolische Steroide vom quantitativen Standpunkt aus keineswegs eine untergeordnete Rolle spielen; so erschienen etwa 8 % der mit Östradiol-17β injizierten Radioaktivität im Urin als 2-Methoxy-Östron. Inzwischen konnten Fishman und Gallagher (15) auch 2-Methoxy-Östriol als Metabolit von Östradiol-17β im Urin des Menschen nachweisen.
Methoxylierung von 2-Hydroxy-Östradiol beschreiben Frandsen (18) und King (36).
Das 2-Methoxy-Östradiol wird zum großen Teil zu Sulfat konjugiert (10).
Unter den bekannten NADPH und Sauerstoff erfordernden Hydroxylierungsreaktionen, die zur irreversiblen Inaktivierung der Östrogene führen, dominiert bei in vitro Versuchen mit Rattenlebern die Hydroxylierung in Position 2 (54, 25, 36).
Im Gegensatz zu anderen mikrosomalen Enzymsystemen der Leber finden wir bei den Hydroxylasen eine extrem geringe Substratspezifität.

Das Schlüsselenzym dieses Systems ist Cytochrom P 450. Es ist autoxydabel und wird dadurch leicht von molekularem Sauerstoff, der überall im Organismus enthalten ist, oxydiert. Das so aktivierte Cytochrom wird von der Cytochrom-P-450-Reduktase reduziert. Dabei wird der aktivierte Sauerstoff abgegeben und auf ein fettlösliches Substrat, das in der lipophilen Umgebung des Cytochroms gelöst ist, übertragen. Die schon oben erwähnte Unspezifität dieses Enzymsystems führt dazu, daß alle mehr oder weniger lipoidlöslichen Substanzen von ganz unterschiedlicher chemischer Struktur entgiftet beziehungsweise inaktiviert werden (21).
Die Wechselzahl des arzneimittelabbauenden Enzymsystems beträgt etwa 10. Diese sehr niedrige Reaktionsgeschwindigkeit wird dadurch ausgeglichen, daß die Leber im Vergleich zu anderen Organen sehr viel Cytochrom P 450, also Endoxydase des unspezifischen Enzymsystems, enthält (21).
Im allgemeinen ist die Aktivität der Hydroxylasen nur gering. Von einer Anzahl Pharmaka ist jedoch bekannt, daß sie bei mehrmaliger Applikation die Bildung dieser arzneimittelabbauenden Enzymproteine in der Leber induzieren. Diese wirken also einer Vergiftung des Zellstoffwechsels entgegen (11).
So führt beispielsweise Barbiturat-Vorbehandlung zu einer entsprechenden Induktion von Hydroxylasen und dadurch einerseits zu einem beschleunigten Abbau des Barbiturates selbst (55), andererseits zu einer verstärkten Inaktivierung anderer Arzneimittel im Organismus (56).
Neben Arzneimitteln sind aber auch Steroide bevorzugte Substrate dieser induzierbaren Hydroxylasen (12).
Die Hydroxylierung von Äthinylöstradiol und Äthinyl-nor-testosteron-acetat wird in der vorliegenden Arbeit besonders berücksichtigt, da bisher wenig über den Metabolismus dieser beiden Komponenten vieler Ovulationshemmer bekannt ist.

Über Äthinyl-nor-testosteron gibt es folgende Untersuchungen: Murata (50) berichtete, daß 17α-Äthinyl-5α-19-norandrostan-17β-ol-3-on und 17α-Äthinyl-5α-19-norandrostan-3β,17β-diol Metaboliten von Äthinyl-nor-testosteron im Harn waren. Sonst ist nur die Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Metaboliten-Fraktionen des Harns untersucht worden (17, 40, 41, 5). Breuer und Mitarbeiter (5) konnten nach Verabreichung von Äthinyl-nor-testosteron keine veränderte 17-Ketosteroidausscheidung feststellen. Palmer und Mitarbeiter (51) fanden bei in vitro Versuchen mit Rattenlebern eine metabolische Abspaltung der Äthinylgruppe.

Über den Metabolismus von Äthinylöstradiol liegen ebensowenig Untersuchungen vor. Abdel-Aziz (1) identifizierte aus Kaninchenharn D-Homoöstron-17a und D-Homoöstron-17aα als Metaboliten von Äthinylöstradiol, das aber zum Großteil unverändert vorlag. In einer späteren Arbeit beschrieb er die 2-Hydroxylierung bei Frauen, denen er Äthinylöstradiol verabfolgte (2).

In anderen Arbeiten (32, 61) wurden die im Harn gefundenen Metaboliten nicht identifiziert.

Bolt (4) fand nach Inkubation von Äthinylöstradiol mit Rattenlebermikrosomen 2-Hydroxy-Äthinylöstradiol als Hauptmetaboliten und daneben eine geringe Menge 6α-Hydroxy-Äthinylöstradiol.

Die Messung von Hydroxylierungsvorgängen erfolgte bisher nur durch Inkubationsversuche mit Leberhomogenat und -mikrosomen oder durch Blut-, Harn- und Stuhluntersuchungen. Der Steroidextraktion folgte jeweils eine langwierige papierchromatographische Isolierung und Identifizierung der Hydroxylierungsprodukte.

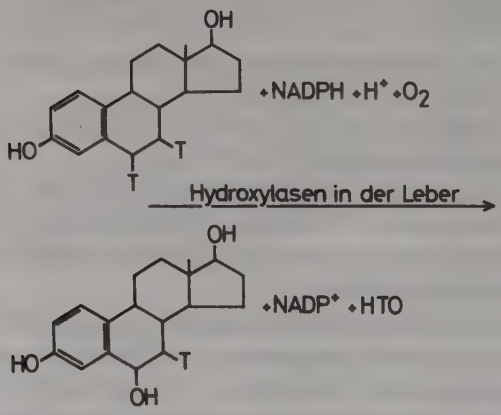
In der vorliegenden Arbeit wird in Anwendung des Prinzips der stoffwechsel-labilen Tritium-Markierung (66, 69, 67) die HTO-Bildung bei der Hydroxylierung der in entsprechender Stellung tritierten Steroide benutzt,

um auf elegante Weise (siehe Methodik) Hydroxylierungsvorgänge in vivo und in vitro zu messen. Zunächst wird jedoch der Beweis geführt, daß tatsächlich nur die enzymatischen Hydroxylierungen mit der HTO-Messung erfaßt werden.

3. Ist die HTO-Bildung aus Tritium-markierten Steroiden ein Maß für die Hydroxylierung?

3.1 Prinzip der Beweisführung

Als Steroid diente Östradiol (E_2) für die durchgeführten Versuche.
Die an den Positionen 6 und 7 meßbare Hydroxylierung von E_2-6,7-T verläuft nach folgender Reaktionsgleichung:



Die Darstellung zeigt, daß zum Ablauf der Reaktion die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich ist. Beim Fehlen von Sauerstoff findet somit keine Hydroxylierung statt, und es entsteht weder HTO noch 6-Hydroxy-E_2. Umgekehrt muß das Zuführen von reinem Sauerstoff die Reaktion beschleunigen.

HTO und 6-Hydroxy-E_2, die nachfolgend untersucht werden, entstehen, wie die Reaktionsgleichung ebenfalls verdeutlicht, jeweils im gleichen Verhältnis. Das gleiche gilt für die 7-Hydroxylierung.
Der Beweis, daß das gemessene HTO tatsächlich der Hydroxylierung entstammt, ist erbracht, wenn unter verschiedenen Versuchsbedingungen jeweils proportionale Mengen HTO und 6-Hydroxy-E_2 gefunden werden. Auch bei Zusatz der als Hydroxylasen-Hemmstoffe bekannten Substanzen Metopiron und Cypronacetat muß sich die dabei auftretende Hemmung durch eine gleichmäßige Abnahme beider Reaktionsprodukte auswirken.
Um das "direkte" Hydroxylierungsprodukt 6-Hydroxy-E_2 quantitativ erfassen zu können, wurde ^{14}C-markiertes E_2 eingesetzt. Das entstehende ^{14}C-markierte 6-Hydroxy-E_2 konnte dann mit einem selbst entwickelten (siehe unter 3.2) zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Verfahren isoliert und die Aktivität bestimmt werden.
Die Sauerstoffabhängigkeit der Hydroxylierung und die Wirkung der Hemmstoffe wird durch zusätzliche Parallelversuche mit E_2-2,4,6,7-T noch verdeutlicht und gesichert. Hier ist eine Messung der Hydroxylierungsreaktion auch an Position 2 und 4 möglich und wir erwarten neben höherer HTO-Bildung größere Differenzen bei den verschiedenen Versuchsbedingungen.
Die Inkubationszeit wird bei den Versuchen mit 15 Minuten so gewählt, daß sie nach Abbildung 8 noch im linearen Bereich liegt, um einen Anstieg der Reaktionsprodukte unter Sauerstoffinkubation zu gewährleisten.
Als Enzymquelle dienten Rattenlebermikrosomen.

3.2 Isolierung und Identifizierung von 6-Hydroxy-östradiol

Die Inkubationsansätze wurden, wie unter Methodik beschrieben, extrahiert. Das Problem war, 6-Hydroxy-E_2

aus diesem Extrakt zu isolieren. Da das papierchromatographische Verfahren von Breuer und Knuppen (6) zeitlich und methodisch recht aufwendig ist, wurde die nachstehend beschriebene dünnschichtchromatographische Methode, modifiziert nach Lisboa und Diczfalusy (47), mit der 6-Hydroxy-E_2 von Östron, Östradiol sowie von 2-Hydroxy-E_2 und 7-Hydroxy-E_2 gut abgetrennt werden kann.

Die zur Trockene eingedampften Inkubationsextrakte wurden in 3 x 0,1 ml Aceton auf eine 0,25 mm dicke, nicht aktivierte DC-Fertigplatte (Kieselgel F 254, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Chromatogramme wurden aufsteigend in folgenden Systemen zweidimensional entwickelt (jeweils Kammersättigung und Zimmertemperatur):

1. Laufrichtung
System 1: Cyclohexan:Essigester = 50 : 50

2. Laufrichtung
System 2: Essigester:wassergesätt.n-Hexan:Äthanol = 80 : 15 : 5

Zur Lokalisierung und Identifizierung des markierten 6-Hydroxy-E_2 wurde die inaktive Form als Referenzsubstanz verwendet (6α-Isomer) und in den unten aufgezeigten Laufmitteln eindimensional chromatographiert.

Maßnahmen zur Identifizierung	Rf-Werte	
	inaktive Referenz-substanz	^{14}C-markiertes Produkt
DC Cyclohexan: Essigester = 50:50	0,105	0,10
DC Essigester: wassergesätt.Äthanol: n-Hexan = 80:15:5	0,35	0,35
DC n-Butanol: Eisessig:H_2O = 66:17:17	0,70	0,71
Mikroacetylierung der eluierten radioaktiven Subst., dann DC in System 1 (hierüber liegen keine Werte aus der Literatur vor)	(Triacetat) 0,42	0,42

Tabelle 1:
Bei der chromatographischen Identifizierung von 6-Hydroxy-E_2 ermittelte Rf-Werte (Durchführung siehe oben)

Die Ergebnisse liefern den Beweis, daß das ^{14}C-markierte Hydroxylierungsprodukt mit 6-Hydroxy-E_2 identisch ist. Eine Trennung der 6α- und 6β-Isomeren findet mit den gewählten Laufmittelsystemen nach Lisboa (47) nicht statt.
Die Lage der inaktiven Referenzsubstanzen wurde entweder im UV-Licht sichtbar gemacht oder durch Ansprühen mit äthanolischer Schwefelsäure (25 ml Äthanol + conc. H_2SO_4 ad. 100 ml). Die radioaktiven Steroide wurden durch direkte Aktivitätsmessung mit dem "DC-

Scanner" in Verbindung mit einem Punktdrucker (65) lokalisiert.
Nachfolgend eine vergleichende Aufstellung von Rf-Werten mit den Laufmittelsystemen 1 und 2 im Vergleich zu den von Lisboa und Diczfalusy gefundenen.

	System 1		System 2	
	Rf	Rf (Lit.)	Rf	Rf (Lit.)
E_1	0,45	0,59	0,59	0,72
E_2	0,33	0,41	0,52	0,64
E_3	0,05	0,06	0,20	0,30
6-OH-E_2	0,10	0,12	0,35	0,47
2-OH-E_2	0,20	0,21	0,48	0,48
7-OH-E_2	-	0,09	-	0,42

Beim Vergleich der obigen Rf-Werte mit denen der Literatur fällt auf, daß bei 2-Hydroxy-E_2 gute, ansonsten weniger gute Übereinstimmung besteht. Diese Differenzen können möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß bei der vorliegenden Arbeit anderes Plattenmaterial zur Verwendung kam und die Platten vor Gebrauch nicht aktiviert wurden. Die hier gefundenen Werte zeigten jedoch bei mehreren Bestimmungen untereinander gute Übereinstimmung. Dies war von größter Wichtigkeit, denn in erster Linie kam es auf die Ausarbeitung einer Methode an, mit der 6-Hydroxy-E_2 nicht nur von Östron, Östradiol, Östriol und 7-Hydroxy-E_2, sondern auch von dem hauptsächlich bei der Hydroxylierung des Östradiols anfallenden 2-Hydroxy-E_2 isoliert werden konnte. Diese Isolierung des 6-Hydroxy-E_2 gelingt mit der vorliegenden Methode eindeutig.

3.2.1 Punktdrucker-Auswertung im Vergleich zur Autoradiographie

Zur Lokalisierung der radioaktiven Steroide auf der Dünnschichtplatte kann neben dem Scanner mit Punktdrucker auch die Autoradiographie eingesetzt werden.

Diese beiden Verfahren wurden bezüglich ihrer Dauer und Deutlichkeit der Darstellung mit Hilfe eines entwickelten Dünnschichtchromatogramms geprüft (siehe Abb. 1, 2 und 3).
Die eingesetzte Gesamtaktivität des aufgetragenen Inkubationsextraktes an ^{14}C betrug 0,34 /uCi; davon fielen, wie die spätere Analyse mit der Flüssig-Scintillationsmessung zeigte, 1,76 % auf 6-Hydroxy-E_2-^{14}C.
Der Punktdrucker wertete bei der hier benötigten Geschwindigkeit von 600 mm/h den in Abbildung 1 erfaßten Plattenausschnitt von 17 x 16 cm in ca. 14 Stunden vollständig aus. Da sich das Interesse meist, wie in diesem Falle, auf einen kleineren Sektor beschränkt, kann auf die Messung der übrigen Fläche verzichtet und die Meßzeit somit auf einen Bruchteil herabgesetzt werden.

^{14}C-E_2-METABOLISMUS in Lebermikrosomen

DC-Auswertung in 14 h (17 • 18 cm)

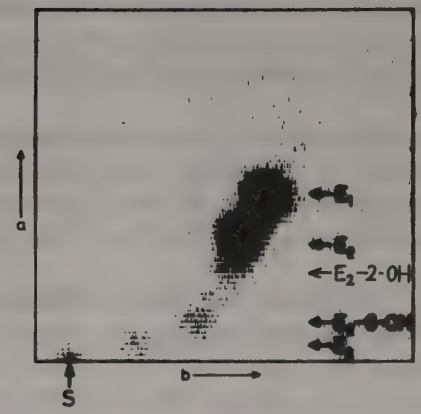


Abbildung 1

Lokalisierung von 6-Hydroxy-E_2-^{14}C auf der Dünnschichtplatte unter Einsatz des DC-Scanners mit Punktdrucker
Die Gesamtaktivität des aufgetragenen Inkubationsextraktes (aerobe Inkubation von E_2-^{14}C mit Rattenlebermikrosomen) beträgt 0,34 /uCi, davon fallen 1,76 % auf 6-Hydroxy-E_2-^{14}C.

Laufrichtung a: Cyclohexan : Essigester = 50 : 50
Laufrichtung b: Essigester : wassergesätt.n-Hexan : Äthanol = 80 : 15 : 5

Auswertungszeit: 14 Std. (Geschw. 600 mm/h, Untersetzungsfaktor: 2, Blende: 2,5 x 2,5 mm)

Abbildung 2:

Autoradiogramm der unter Abbildung 1 beschriebenen Dünnschichtplatte

Belichtungszeit: 24 Std. (Kodak-Safety-Film 1)

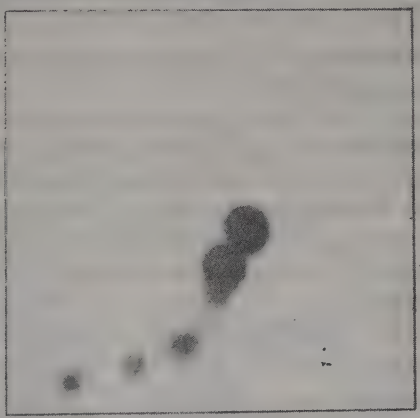


Abbildung 3:

Autoradiogramm der unter Abbildung 1 beschriebenen Dünnschichtplatte

Belichtungszeit: 7 Tage

Durch die Autoradiographie wurden nach 24 Stunden nur die stark aktiven Flecken von Östron-^{14}C und unverändertem E_2-^{14}C bei der Entwicklung sichtbar. Erst nach einer Belichtungszeit von einer Woche war das Ergebnis mit der Punktdrucker-Darstellung vergleichbar. Die Deutlichkeit der Abbildungen war dann mit beiden Methoden gleich gut (siehe Abb. 1, 2 und 3).
Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen: Bei qualitativ gleicher Darstellungsmöglichkeit entwickelter radioaktiver Dünnschichtchromatogramme mit beiden getesteten Methoden kann eine wesentliche Zeitersparnis durch Einsatz des Scanners mit Punktdrucker erzielt werden. Diese würde sich bei niedrigeren Aktivitäten noch vergrößern.

3.3 Parallelität der Östradiol-Hydroxylierung, gemessen mit E_2-6,7-T, E_2-2,4,6,7-T und E_2-^{14}C

3.3.1 Inkubationsversuche: aerob, anaerob und unter reinem Sauerstoff

Bei der Inkubation von E_2-^{14}C und E_2-6,7-T mit Lebermikrosomen männlicher Ratten zeigte sich, daß unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen annähernd gleiche Mengen 6-Hydroxy-E_2-^{14}C beziehungsweise HTO gebildet werden (Tabelle 2). Unter aeroben Bedingungen entstehen 1,8 % 6-Hydroxy-E_2-^{14}C parallel mit 2,21% HTO, Entspr. $8{,}23 \cdot 10^{-7}$/uMol/mg Leber (Mikrosomen)/min (jeweils gemessen an 100 % eingesetzter Aktivität).
Bei Inkubation mit reinem Sauerstoff verdoppelt sich die Bildung der Hydroxylierungsprodukte, und unter anaeroben Bedingungen geht sie auf nahezu 0,1 % in beiden Fällen zurück. Der kleine Restbetrag kann darauf zurückgeführt werden, daß trotz Vorinkubation noch Spuren von Sauerstoff zurückblieben.

	% 6-Hydroxy-E_2-^{14}C			% HTO		
	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n
anaerob	0,11	±0,05	4	0,15	±0,05	6
aerob	1,80	±0,22	8	2,21	±0,48	6
+ O_2	3,68	±0,59	5	3,88	±0,18	3
aerob + Met.	0,34	±0,11	4	0,34	±0,14	7
aerob + Cyp.	0,90	±0,05	2	0,82	±0,26	3
aerob + Barb.	1,21	±0,11	2	1,05	±0,05	2

Tabelle 2:
Vergleich der HTO-Bildung aus E_2-6,7-T mit der Bildung von 6-Hydroxy-E_2-^{14}C aus E_2-4-^{14}C durch Hydroxylierung in vitro unter verschiedenen Versuchsbedingungen.
(Versuchstiere: Rattenmännchen)
$\bar{x}$: Mittelwert der eingesetzten Aktivität in %, als HTO bzw. 6-Hydroxy-E_2-^{14}C vorliegend
Das E_2 wurde in 3 ml Tris/HCl-Puffer-Lsg., die jeweils 280 mg Lebergewebe entsprechende Mikrosomensuspension sowie 0,5 mg NADPH (= 27 µMol/l) enthielt, unter folgenden Bedingungen 15 Min. bei 37°C inkubiert:

a) unter 95 % N_2/5 % CO_2 (anaerob)
b) aerob (Luft)
c) unter reinem O_2
d) unter Zusatz von Cyproteronacetat (0,06 mg/Ansatz = $4{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l)
e) unter Zusatz von Metopiron (0,06 mg/Ansatz = $8{,}7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l)
f) unter Zusatz von Phenobarbital-Na (0,06 mg/Ansatz = $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l)

Bei Versuch a) und c) wurde das Substrat erst aus einem Seitenarm eingeschwenkt, nachdem anaerobe Bedingungen bzw. O_2-Atmosphäre hergestellt waren.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze entweder (bei Tritium-Markierung) einer Gefrierdestillation unterworfen und das Wasserdestillat auf den HTO-Teil untersucht, oder es wurde (bei ^{14}C-Markierung) durch Dünnschichtchromatographie der Chloroformextrakte 6-Hydroxy-E_2-^{14}C bestimmt.

Eingesetzte Steroidmengen/Ansatz (3 ml):

E_2-4-^{14}C : 0,34 µCi $\hat{=}$ 0,788 x 10^{-2} µMol
(spez.Akt.: 43,2 µCi/µMol)

E_2-6,7-T : 4,28 µCi $\hat{=}$ 0,788 x 10^{-2} µMol
(spez.Akt.: 545,0 µCi/µMol)

= Konzentration: 2,6 µMol/l

Barbiturat-Vorbehandlung der Versuchstiere entspr. Abb. 14

n = 2

O_2-Abhängigkeit der Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T

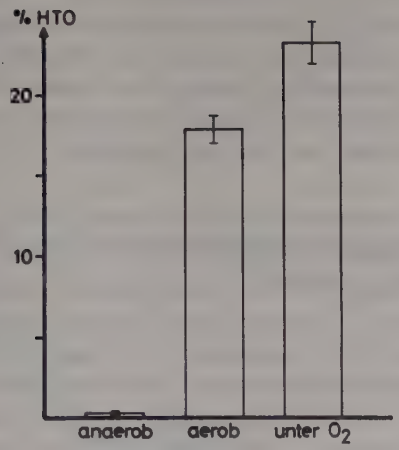


Abbildung 4:
Sauerstoff-Abhängigkeit der HTO-Bildung aus E_2-2,4,6,-T durch Hydroxylierung in vitro
(Versuchstiere: Rattenmännchen)
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO vorliegend
Versuchsbedingungen wie unter Tabelle 2 a), b), c)
Eingesetzte Steroidmenge/Ansatz (3 ml):
E_2-2,4,6,7-T: 1 µCi $\hat{=}$ 0,788 x 10^{-2} µMol
(spez.Akt.: 127 µCi/µMol)
= Konzentration: 2,6 µMol/l
Barbiturat-Vorbehandlung der Versuchstiere entspr. Abb. 14
n = 2

Der oben beschriebene Versuch wurde dann in gleicher Weise mit E_2-2,4,6,7-T durchgeführt. Dabei wurde nach aerober Inkubation 17,8 % HTO, entspr. 1,33 · 10^{-6}/uMol/mg Leber (Mikrosomen)/min, nach Inkubation mit Sauerstoff 23,4 % HTO und nach anaerober Inkubation 0,3 % HTO gefunden (Abb. 4). Auch hier tritt die Sauerstoff-Abhängigkeit der Reaktion klar zutage. Die Hydroxylierung unter Luftzutritt scheint in diesem Falle jedoch schon so erheblich zu sein, daß der Anstieg unter Sauerstoff geringer ist als bei E_2-6,7-T.

3.3.2 Inkubationsversuche unter Zusatz von Metopiron, Cyproteronacetat und Phenobarbital-Na (aerob)

Wie Tabelle 2 zeigt, verhält sich auch bei paralleler Inkubation von E_2-^{14}C und E_2-6,7-T unter Hemmstoffzusatz die Bildung von 6-Hydroxy-E_2-^{14}C und HTO gleich. Bei der erwählten Konzentration von 0,06 mg/Ansatz(/uMol/l s.unter Tab.2) senkte das Barbiturat, als kompetitiver Inhibitor, 6-Hydroxy-E_2-^{14}C von 1,80 % auf 1,21 % und HTO von 2,21 % auf 1,05 %. Metopiron senkte bei gleicher Konzentration beide Hydroxylierungsprodukte auf 0,34 %, und Cyproteronacetat läßt die Bildung von 6-Hydroxy-E_2-^{14}C auf 0,90 % und die von HTO auf 0,82% zurückgehen.

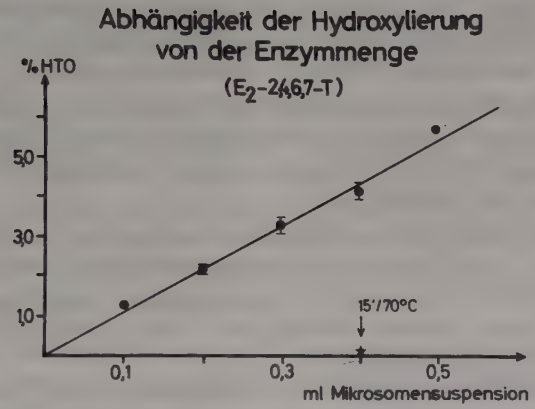


Abbildung 5:
Abhängigkeit der Hydroxylierungsrate von der Enzymmenge, gemessen bei E_2-2,4,6,7-T
(Versuchstiere:Rattenmännchen)
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO vorliegend
Abszisse: Enzymmenge in ml Mikrosomensuspension
0,1 ml Suspension ≙ 70 mg Lebergewebe
Versuchsdurchführung vergl. Tabelle 2
Inkubation: aerob, 15 Min. bei 37°C
Eingesetzte E_2-Menge:
1,06 µCi/Ansatz (3 ml) ≙ 30,0 µMol/l
(spez. Akt.: 11,7 µCi/µMol)
Barbiturat-Vorbehandlung der Versuchstiere entspr. Abb. 14
n = 2

3.4 Ausschluß der chemischen Labilisierung des Tritiums

Die gleichhohen Meßwerte für HTO und 6-Hydroxy-E_2-^{14}C unter den verschiedenen Versuchsbedingungen der vorhergehenden Parallelversuche, d.h. gleicher Anstieg oder

Abfall, sprechen gegen eine chemische Labilisierung des Tritiums (z.B. durch Enolisierung). Um aber selbst eine geringe, nicht durch die enzymatische Hydroxylierung entstehende HTO-Menge erfassen zu können, wurde die Gewebsabhängigkeit der Reaktion geprüft. Hydroxylierung ohne HTO-Bildung durch Wandern des Tritiums im Molekül ("NIH-Shift") ist nur bei Aromaten-gebundenem Tritium bekannt (20).
Bei Substratsättigung (Substrat = E_2-2,4,6,7-T: 30 µMol/l) wurden 0,1 - 0,5 ml Lebermikrosomensuspension dem Inkubationsansatz zugefügt und aerob inkubiert. Dabei ergab sich eine lineare Abhängigkeit des entstehenden HTO von der Gewebsmenge (Abb. 5).
Bei Inkubation mit 0,4 ml Mikrosomensuspension, die zuvor zur Denaturierung des Enzym-Proteins 15 Minuten auf 70°C erhitzt wurden, entstanden nur 0,01 % HTO.
Diese Ergebnisse lassen eindeutig auf eine enzymatische HTO-Bildung schließen.

Zusammenfassend kann zu Punkt 3 folgendes gesagt werden: Mit den hier vorliegenden Versuchsergebnissen ist der Beweis erbracht, daß das bei Einsatz Tritiummarkierter Steroide gebildete HTO ein Maß für die Hydroxylierung dieser Steroide darstellt.
Dieses Ergebnis kann ohne weiteres auch auf die unter Punkt 5 aufgeführten in vivo Hydroxylierungen übertragen werden, was spätere Vergleiche von in vivo zu in vitro Versuchen bestätigen.

4. Charakteristika der Hydroxylierungsreaktion

Die bisherigen Versuchsergebnisse lassen deutlich erkennen, daß eine von Enzymen (Hydroxylasen) abhängige Hydroxylierung vorliegt, und zwar

a) durch die erwiesene Sauerstoffabhängigkeit der Reaktion, denn enzymatische Hydroxylierungen benötigen Sauerstoff (siehe Reaktionsgleichung unter 3.1);
b) durch die Abnahme der Reaktionsprodukte bei Zugabe des Hydroxylasenhemmstoffes Metopiron (22, 33, 35, 37) oder von Cyproteronacetat, das sich ebenfalls in dieser Richtung als wirksam erwies (31, 74);
c) durch die lineare Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymmenge und Ausbleiben einer Umsetzung bei Enzym-Denaturierung.

Die Umsatzgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen wird von Substratkonzentration, Wasserstoffionenkonzentration, Inkubationszeit und -temperatur bestimmt. Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurde letztere konstant auf 37°C gehalten und die anderen Parameter variiert.

4.1 Zeitabhängigkeit

Wie Abbildung 6 zeigt, steigt die HTO-Bildung mit zunehmender Inkubationsdauer an, wobei bis zu 15 Minuten eine etwa lineare Abhängigkeit besteht. Nach ca. 30 Minuten ist das Maximum der Umsetzung erreicht.
Wie bisher dienten Mikrosomen als Enzymquelle. Als Substrat wurde E_2-2,4,6,7-T eingesetzt.

4.2 pH-Abhängigkeit

Zur Prüfung der optimalen pH-Bedingungen wurden die Inkubationen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, daß bei pH 7,4 die größte Menge des Hydroxylierungsproduktes HTO entsteht. Substrat war wiederum E_2-2,4,6,7-T.

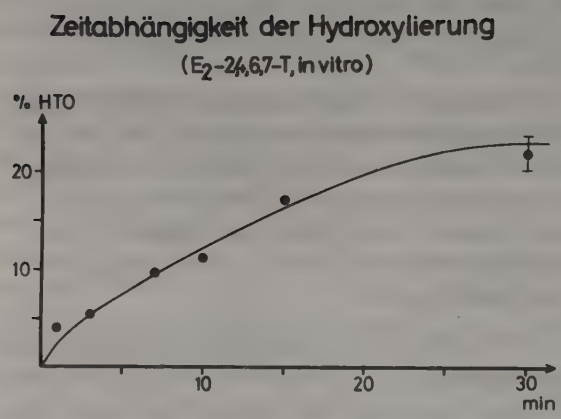


Abbildung 6
Zeitabhängigkeit der in vitro Hydroxylierung, gemessen bei E_2-2,4,6,7-T
(Versuchstiere: Rattenmännchen)
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO vorliegend
Versuchsdurchführung vergl. Tabelle 2
Inkubation: aerob bei 37°C;
Zeit: 1,3,7,10,15 und 30 Minuten
Eingesetzte E_2-Menge: 2,6 µMol/l
Barbiturat-Vorbehandlung der Versuchstiere entspr. Abbildung 14
n = 2

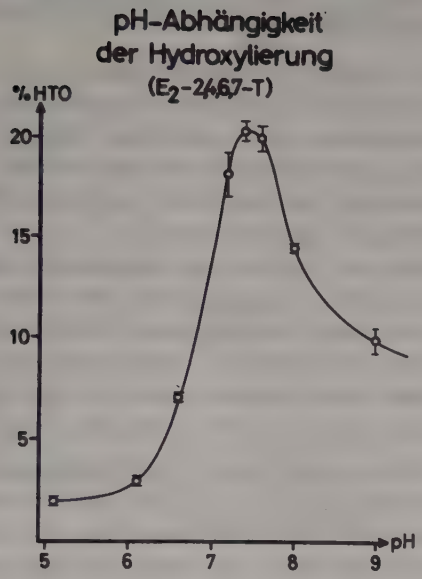


Abbildung 7
pH-Abhängigkeit der in vitro Hydroxylierung, gemessen bei E_2-2,4,6,7-T
(Versuchstiere: Rattenweibchen)
Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO vorliegend
Versuchsdurchführung vergl. Tabelle 2
Inkubation: aerob, 15 Minuten bei 37°C;
in Sörensen-Phosphat-Puffer bei pH 5.1, 5.6, 6.1 und 6.6
in Tris-HCl-Puffer bei pH 7.2, 7.4, 7.6, 8.0 und 9.0
Eingesetzte E_2-Menge: 2,6 /uMol/l
Keine Barbiturat-Vorbehandlung der Versuchstiere
n = 2

4.3 Konzentrationsabhängigkeit mit und ohne Hemmstoffzusatz (Bestimmung der K_m-Werte und Inhibitor-Konstanten)

Die folgenden Versuche zur Enzymkinetik dienten der Charakteristisierung von Hydroxylierungen verschiedener Steroid-Substrate. Sie wurden auch jeweils mit den als Hydroxylierungshemmstoffen ermittelten Substanzen Cyproteronacetat und Metopiron durchgeführt, um deren Hemmwirkung zu spezifizieren.
Äthinylöstradiol und Äthinyl-nor-testosteron-acetat, von denen die in vivo Hydroxylierung und deren Induzierbarkeit besonders interessierte (siehe Punkt 5), wurden auch hier als Substrate eingesetzt, um weitere Aufschlüsse über deren Hydroxylierung zu bekommen und Vergleichsmöglichkeiten zum Verhalten in vivo zu haben.

Die Versuchstiere wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Barbiturat vorbehandelt, um eine besser meßbare Ausbeute zu erzielen. Aus dem gemessenen HTO wurden für die K_m-Wert-Bestimmung die Menge an gebildeten Hydroxylfunktionen in /uMol berechnet.

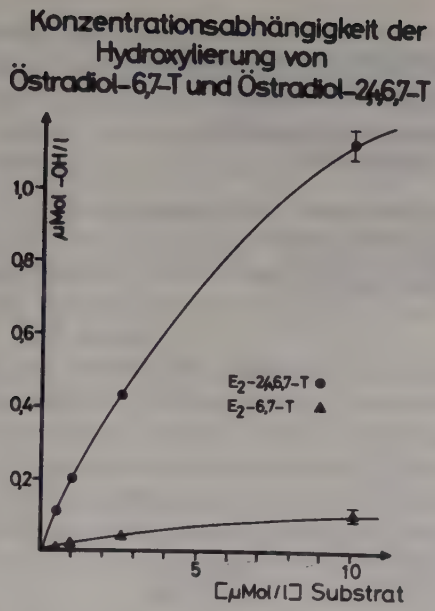


Abbildung 8
Konzentrationsabhängigkeit der in vitro Hydroxylierung von E_2-6,7-T und E_2-2,4,6,7-T
(Versuchstiere: Rattenmännchen)
Ordinate: /uMol der an den Tritium-markierten Positionen gebildeten Hydroxyl-Funktionen
Versuchsdurchführung wie unter Tabelle 2
Inkubation: aerob, 15 Minuten bei 37°C
Eingesetzte E_2-Konzentrationen: jeweils steigend von 0,5 bis 10 /uMol/l
Barbiturat-Vorbehandlung der Versuchstiere entspr. Abbildung 14
n = 2

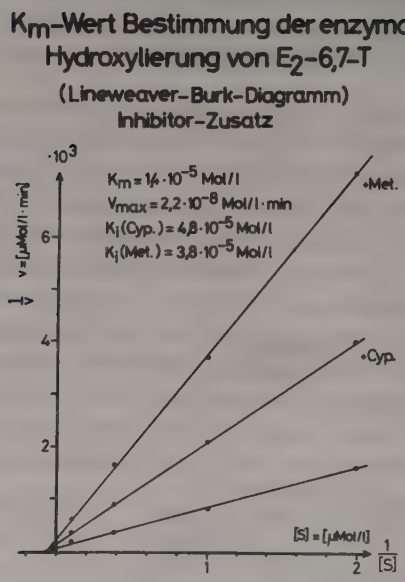


Abbildung 9

Bestimmung des K_m-Wertes nach Lineweaver-Burk für die Hydroxylierung von E_2-6,7-T in Rattenlebermikrosomen sowie Bestimmung der Inhibitorkonstanten für Cyproteronacetat und Metopiron

Es liegt Abbildung 8 zugrunde (für E_2-6,7-T) Außerdem erfolgte die gleiche Durchführung mit je 0,06 mg Cyproteronacetat ($4{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) bzw. Metopiron ($8{,}7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) pro Inkubationsansatz.

4.3.1 E_2-6,7-T

Lebermikrosomen männlicher Ratten wurden mit E_2-6,7-T in steigenden Konzentrationen, bis 10 /uMol/l, aerob inkubiert (Abb. 8). Das Gleiche wurde unter Zusatz von 0,06 mg Cyproteronacetat ($4,8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) bzw. Metopiron ($8,7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) pro Ansatz durchgeführt.

Wird die Beziehung zwischen Konzentration an E_2-6,7-T (2,6 /uMol/l) Ausbeute an Hydroxylfunktionen nach Lineweaver-Burk aufgetragen (Abb. 9), so ergibt sich für die Hydroxylierung von E_2-6,7-T ein K_m-Wert von $1,4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.
Zusatz der Hemmstoffe vermindert die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, während der K_m-Wert konstant bleibt. Das sind die Kriterien für eine nichtkompetitive Hemmung. Wie in den Versuchen unter Punkt 3.3.2, zeigt sich auch hier die stärkere Hemmwirkung von Metopiron. Die Inhibitorkonstante für Cyproteronacetat beträgt $4,8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, für Metopiron $3,8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

4.3.2 E_2-2,4,6,7-T

Die Versuchsdurchführungen und Auswertungen erfolgten analog denen mit E_2-6,7-T. Zusätzlich wurden Mikrosomen einer unvorbehandelten männlichen Ratte bei den verschiedenen Konzentrationen mit E_2-2,4,6,7-T inkubiert (Abb. 10).
Es bestätigt sich auch hier die größere Hemmwirkung von Metopiron gegenüber Cyproteronacetat bei der E_2-Hydroxylierung. Die Inhibitorkonstante für Cyproteronacetat ist $2,4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, bzw. für Metopiron $1,7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.
Mit diesem in vitro Versuch wird außerdem die später in vivo untersuchte Enzyminduktion veranschaulicht. Nach Barbiturat-Vorbehandlung finden wir eine 13 % höhere Hydroxylierungsrate.

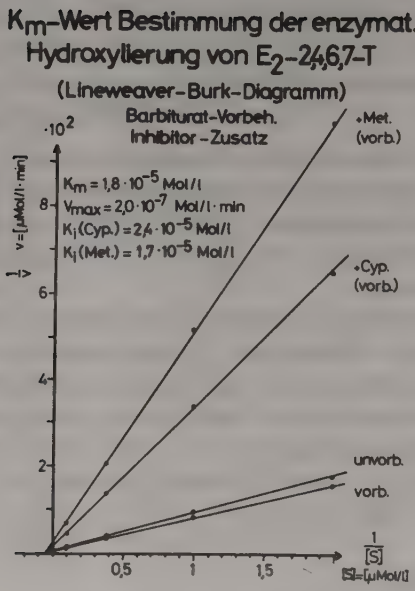


Abbildung 10

Bestimmung des K_m-Wertes nach Lineweaver-Burk für die Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T in Rattenlebermikrosomen sowie Bestimmung der Inhibitorkonstanten für Cyproteronacetat und Metopiron;
zusätzlich Ermittlung des Einflusses der Barbiturat-Vorbehandlung
Es liegt Abbildung 8 zugrunde (für E_2-2,4,6,7-T)
Außerdem erfolgte die gleiche Durchführung mit je 0,06 mg Cyproteronacetat ($4{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) bzw. Metopiron ($8{,}7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) pro Inkubationsansatz (= 3 ml) sowie der Einsatz nicht mit Phenobarbital-Na vorbehandelter Tiere.

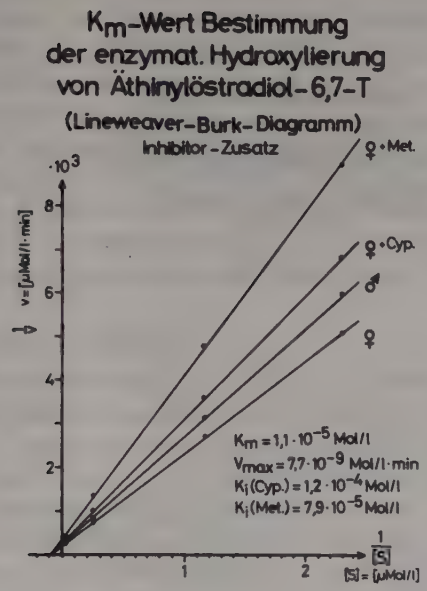


Abbildung 11

Bestimmung des K_m-Wertes nach Lineweaver-Burk für die Hydroxylierung von Äthinyl-E_2-6,7-T in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Ratten sowie Bestimmung der Inhibitorkonstanten für Cyproteronacetat und Metopiron
Ausführung entspr. Abb. 8 und 9

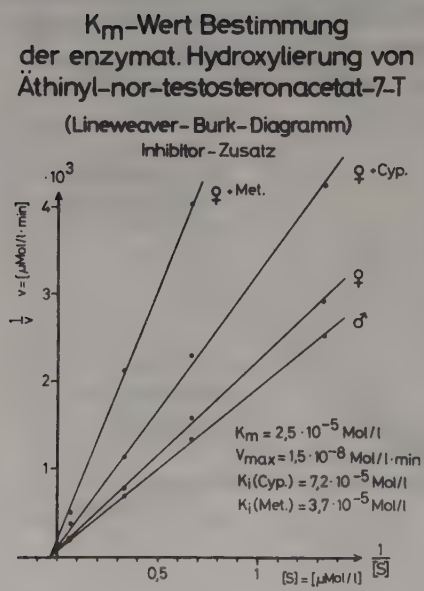


Abbildung 12

Bestimmung des K_m-Wertes nach Lineweaver-Bruk für die Hydroxylierung von Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Ratten sowie Bestimmung der Inhibitorkonstanten für Cyproteronacetat und Metopiron
Ausführung entspr. Abb. 8 und 9

Der ermittelte K_m-Wert liegt jeweils bei $1,8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l (Abb. 10). Abbildung 8 macht erneut deutlich, wie stark die HTO-Ausbeute steigt, wenn E_2 nicht nur an C-Atom 6 und 7 sondern auch an C-2 und C-4 mit Tritium markiert ist.
Bei den Rechnungen geht nur die Hydroxylierung an C-2 ein, da sie an C-6 und C-7 nur 1/10 der Ausbeute ausmacht und damit innerhalb der Fehlerbreite liegt.
Auch an C-4 findet nur eine sehr geringe Hydroxylierung durch Rattenlebermikrosomen statt (25).

4.3.3 Äthinyl-E_2-6,7-T

Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Ratten wurden mit steigender Konzentration Äthinyl-E_2-6,7-T aerob inkubiert. Die Hemmwirkung von Cyproteronacetat und Metopiron wurde bei Inkubationen mit Mikrosomen weiblicher Tiere untersucht. Es ergab sich bei den Weibchen eine stärkere Hydroxylierung als bei den Männchen.
Metopiron (Inhibitorkonstante: $7,9 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) hemmt mehr als Cyproteronacetat (Inhibitorkonstante: $1,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l).
Der K_m-Wert ist jeweils identisch und liegt bei $1,1 \cdot 10^{-5}$ Mol/l (Abb. 11).

4.3.4 Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T

Die Inkubationen wurden analog denen mit Äthinyl-E_2-6,7-T durchgeführt.
Mit Mikrosomen männlicher Ratten wurde eine stärkere Hydroxylierung erzielt als mit Mikrosomen weiblicher Tiere.
Die Hemmung unter Zusatz von Metopiron war auch hier wieder ausgeprägter. Die Inhibitorkonstante von Cyproteronacetat beträgt $7,2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, die von Metopiron $3,7 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.
Der K_m-Wert liegt jeweils bei $2,5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l (Abb. 12).

4.3.5 Die Hydroxylierungshemmstoffe Metopiron und Cyproteronacetat

Die Versuche mit und ohne Hemmstoffzusatz (siehe Punkt 4.3 sowie 3.3.2) zeigen, daß beide Substanzen, sowohl das als Inhibitor von Hydroxylierungsvorgängen bekannte Metopiron (22, 33, 35, 37) als auch das Antiandrogen Cyproteronacetat (31, 74) die untersuchten Hydroxylierungen hemmen.
Wir haben es hierbei mit nicht kompetitiven Inhibitoren zu tun. Diese Aussage kann anhand der Kurvenverläufe in den Lineweaver-Burk-Diagrammen gemacht werden, und zwar sind, wie schon erwähnt, identische K_m-Werte bei unterschiedlicher Kurvensteigung die Kriterien für diesen Hemmtyp (Abb. 9, 10, 11, 12).
Die in der nachfolgenden Tabelle noch einmal zusammengefaßten Inhibitorkonstanten (= K_i-Werte) stellen die Dissoziationskonstanten des jeweiligen Enzym-Inhibitor-Komplexes dar. Der Komplex mit Metopiron hat bei allen Untersuchungen die kleinere Dissoziationskonstante als der mit Cyproteronacetat. Somit läßt sich auch die größere Hemmwirkung von Metopiron auf die Hydroxylierung der Steroide erklären. Beide Inhibitoren haben auch in vivo eine objektivierbare Wirkung, wie spätere Versuche unter Punkt 5 zeigen (vergl. Abb. 17).

Substrat der Hydroxylierung	Inhibitorkonst. (K_i) [Mol/l] Cyproteronacetat	Metopiron
E_2-6,7-T	$4{,}8 \cdot 10^{-5}$	$3{,}8 \cdot 10^{-5}$
E_2-2,4,6,7-T	$2{,}4 \cdot 10^{-5}$	$1{,}7 \cdot 10^{-5}$
Äthinyl-E_2-6,7-T	$1{,}2 \cdot 10^{-4}$	$7{,}9 \cdot 10^{-5}$
Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T	$7{,}2 \cdot 10^{-5}$	$3{,}7 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 5
Inhibitorkonstanten von Cyproteronacetat und Metopiron bei der Hydroxylierung von E_2-6,7-T, E_2-2,4,6,7-T, Äthinyl-E_2-6,7-T und Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T

Die Berechnung erfolgte aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen unter Zugrundelegung der Beziehung

$$\frac{V_{(max)}}{V_{i(max)}} = 1 + \frac{(I)}{K_i} \qquad (I) = \text{Inhibitorkonzentration (Mol/l)}$$

In vitro wurde nur bei E_2-2,4,6,7-T ein Vergleich zwischen dem Hydroxylierungsvermögen von Lebern vorbehandelter und unvorbehandelter Tiere angestellt, weil hier die Fragestellung hauptsächlich die Parallelität der entstehenden Hydroxylierungsprodukte bei Einsatz Tritium-markierter Steroide einerseits und die ^{14}C-markierter andererseits betraf. Bei den nun folgenden in vivo Versuchen ist dagegen der Absolutwert mit bzw. ohne Vorbehandlung von Interesse.

5. Hydroxylierungen in vivo, mit und ohne Barbiturat-Vorbehandlung

5.1 Prinzip der in vivo Messung

Die Methode der Radiospirometrie erlaubt es, die Umsatzquote eines mit "stoffwechsel-labilem" Tritium markier-

ten Stoffes im Organismus zu bestimmen. Sie wurde anfangs zur Messung von Oxydationsreaktionen nach folgendem Schema entwickelt (66):

Östradiol-17α-T + NAD/NADP $\xrightarrow{\text{17B-OH-Steroid-DH}}$ Östron + NADT/NADPT $\xrightarrow{\text{Atmungskette}}$ HTO im Körperwasser

Die Radiospirometrie kann, wie von Wenzel und Mitarbeitern (68) beschrieben und in der vorliegenden Arbeit durch die in vitro Versuche bewiesen, auch zur Messung von Hydroxylierungsreaktionen herangezogen werden (Formelschemen siehe unter 1. und 3.1).

Das hier aufgezeigte Nachweisverfahren für Hydroxylierungen innerhalb des intakten Organismus ist eine Variante der Stoffwechsel-labilen Tritium-Markierung insofern, als das stabil in das Kohlenstoffgerüst des Steroids gebundene Tritium durch eine Stoffwechselleistung aus dem Molekül entfernt wird.
Da die Steroid-Hydroxylierung im Organismus der Versuchstiere, aber auch beim Menschen (70), an C-6 und C-7 normalerweise kaum, sondern nur nach Arzneimittel-Behandlung abläuft, können wir in diesen Fällen nur von einer "bedingt stoffwechsel-labilen" Tritium-Markierung sprechen.

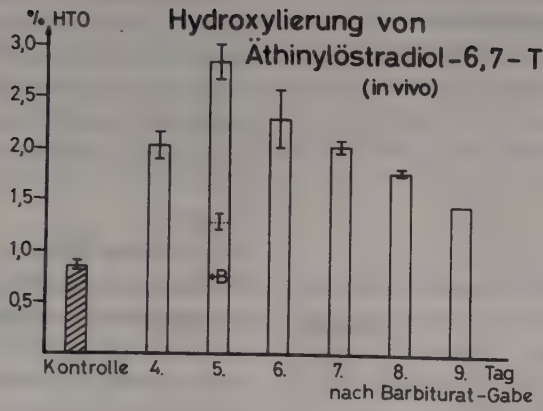


Abbildung 13

HTO-Bildung in Rattenweibchen nach Injektion von Äthinyl-E_2-6,7-T in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Barbiturat-Vorbehandlung

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Hydroxylierung an C-Atom 6 und/oder 7. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten mit den jeweils eingezeichneten Standardabweichungen (n = 4)

Barbiturat-Vorbehandlung und Steroidinjektion wie bei Abbildung 14

Radiospirometrie: 4.-9. Versuchstag, HTO-Werte 4,5 Stunden nach Steroidinjektion

Gestrichelte Linie am 5. Tag: Zusätzliche Barbituratgabe (40 mg/kg) gleichzeitig zur Steroidinjektion

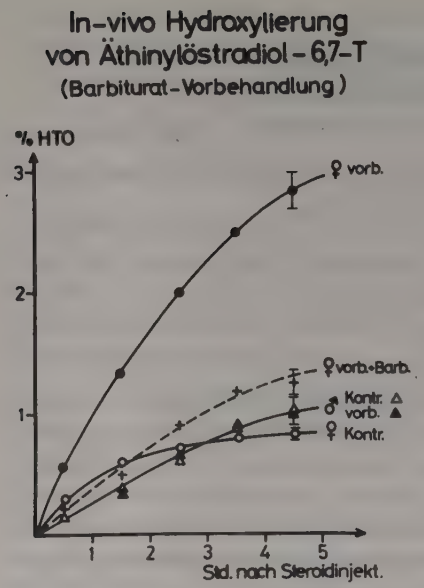


Abbildung 14
HTO-Bildung in Rattenmännchen und -weibchen nach Injektion von Äthinyl-E_2-6,7-T mit und ohne Barbiturat-Vorbehandlung

Ordinate:
% der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Hydroxylierung an C-Atom 6 und/oder 7

Barbiturat-Vorbehandlung: 3 Tage zweimal täglich 40 mg/kg (1.,2. und 3. Tag des Versuchs)

i.p. Injektion des in Äthanol gelösten Steroids: 10 µCi ≙5,9γ/Ratte; spez.Akt.: 500 µCi/µMol

Radiospirometrie: am 5. Tag des Versuchs; HTO-Werte 1,5 bis 4,5 Stunden nach Steroidinjektion

Gestrichelte Kurve: am 5. Tag zusätzliche Barbituratgabe (40 mg/kg)

n = 4

Auch Proben mit geringer Aktivität (HTO-Ausbeute <1 %) lassen sich gut vom Null-Effekt abgrenzen. In diesem Bereich werden Werte zwischen 66 und 300 IPM/ml H_2O gemessen, während der Null-Effekt um 20 IPM liegt.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Metabolismus von Äthinyl-E_2 und Äthinyl-nor-testosteron-acetat, den nicht in der Natur vorkommenden Steroiden, stellt die Radiospirometrie eine elegante Bestimmungsmethode dar. Sie macht es möglich, die Inaktivierung dieser beiden Komponenten vieler Ovulationshemmer durch Barbiturat-induzierte Hydroxylierung direkt in vivo zu messen.

5.2 Äthinyl-E_2-6,7-T

Als Indikatorsteroid für die Induzierbarkeit der Hydroxylasen durch Barbiturat-Vorbehandlung diente zunächst die östrogene Komponente, Äthinyl-E_2-6,7-T. Der Versuch sollte außerdem klären, wieviel Tage nach der Vorbehandlung das Steroid am stärksten hydroxyliert wird.

In Abbildung 13 ist die HTO-Bildung in Rattenweibchen 4,5 Stunden nach Injektion von Äthinyl-E_2-6,7-T mit und ohne Vorbehandlung dargestellt. Den höchsten HTO-Wert von 2,8 % erhält man 2 Tage nach Absetzen des Phenobarbitals (5. Versuchstag), während bei den Kontrolltieren nur 0,8 % Tritium als HTO freigesetzt wird.

Am 5. Versuchstag wurde zusätzlich zum Indikatorsteroid Phenobarbital (1 · 40 mg/kg) injiziert. Dadurch fiel die HTO-Bildung auf 1,2 %, was sich aus der Konkurrenz um die gleichen Hydroxylasen erklärt. Diese Konkurrenz um die induzierten Hydroxylasen fand auch Conney bei seinen in vitro Versuchen (11).
Bei den Männchen lag die gemessene HTO-Menge am 5. Versuchstag, 4,5 Stunden nach Steroidinjektion um 1 %, und zwar interessanterweise unabhängig davon, ob die Tiere Barbiturat-vorbehandelt waren oder nicht (Abbildung 14).

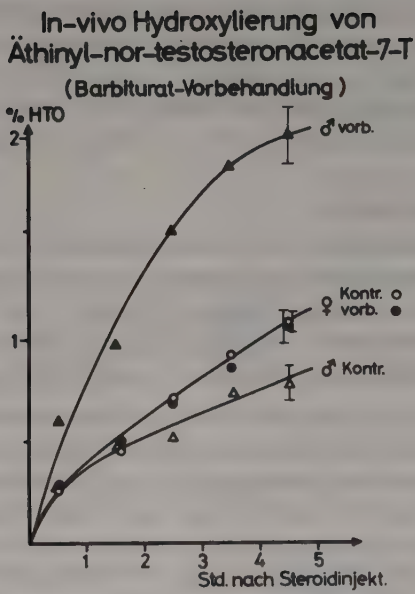


Abbildung 15

HTO-Bildung in Rattenmännchen und -weibchen nach Injektion von Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7 mit und ohne Baribturat-Vorbehandlung

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Hydroxylierung an C-Atom 7

Barbiturat-Vorbehandlung und Radiospirometrie wie bei Abbildung 14

i.p. Injektion des in Äthanol gelösten Steroids: 10 /uCi ≙ 4,38γ/Ratte; spez.Akt.: 780 /uCi/ /uMol

n = 4

Für die Problematik bei den Proben mit geringer Aktivität gilt das unter Abbildung 14 gesagte.

5.3 Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, konnte auch bei Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T, der gestagenen Komponente, nach Barbiturat-Vorbehandlung eine erhöhte HTO-Bildung und damit Hydroxylierung festgestellt werden, hier allerdings umgekehrt nur bei männlichen Ratten. Während bei den Kontrolltieren am 5. Versuchstag, 4,5 Stunden nach Steroidinjektion, nur 0,8 % HTO gefunden wurden, entstanden nach Phenobarbital-Gaben 2,0 %. Bei einer Fehlerbreite von maximal 8 % des Meßwertes ist der Unterschied signifikant.
Die Weibchen zeigten mit und ohne Vorbehandlung eine Hydroxylierungsrate von 1,1 %.

5.4 E_2-2,4,6,7-T

Waren die in vivo Versuche mit Äthinyl-E_2-6,7-T und Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T besonders interessant in Hinblick auf die indizierte Inaktivierung dieser kontrazeptiven Substanzen, so wurde die in vivo Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T in erster Linie zur Klärung folgender Fragen durchgeführt:

1. Wie verhält sich hier die HTO-Bildung im Vergleich zu den entsprechenden Untersuchungen mit nur an Position 6 und 7 tritiertem E_2? (Die Vergleichswerte der in vivo Hydroxylierung von E_2-6,7-T wurden von G. Köster (68) übernommen)
2. Wie stellt sich die Hemmwirkung von Cyproteronacetat und Metopiron auf die Hydroxylierung in vivo dar, und was bewirkt gleichzeitig zum Steroid verabfolgtes Barbiturat?
3. Läßt sich eine Parallelität der Ergebnisse in vivo zu in vitro feststellen?

Abbildung 16 zeigt bei Barbiturat-Vorbehandelten Rattenweibchen, 4,5 Stunden nach Injektion von E_2-2,4,6,7-T, eine Tritium-Aktivität im Körperwasser, die 34 % der eingesetzten Aktivität entspricht. Eine gleichzeitige Phenobarbital-Injektion (40 mg/kg) nach Vorbehandlung senkte den Wert auf 21 %. Die Kontrollwerte unvorbehandelter Weibchen lagen bei 30 %. Wurde diesen Tieren zusätzlich zum Steroid Cyproteronacetat bzw. Metopiron (jeweils 6 mg/kg) appliziert, so sank die HTO-Bildung, d.h. Hydroxylierung, zum gleichen Zeitpunkt auf 9,2 % bzw. 7,8 %. Wir sehen also, daß Metopiron auch in vivo stärker als Cyproteronacetat inhibiert (Abbildung 17). Die aufgrund des in vivo Versuches mit Äthinyl-E_2-6,7-T erwartete Hemmung durch Barbiturat läßt sich, wie schon erwähnt, mit der Konkurrenz um die Hydroxylasen (kompetitive Hemmung) erklären (11). Auch dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem in vitro Befund.

Wurden männliche Ratten verwendet, stieg die HTO-Bildung nach Vorbehandlung auf 16 %, während die Kontrollwerte bei 14 % lagen.
In der folgenden Tabelle werden alle Ergebnisse dieses Versuchs noch einmal mit den entsprechenden Werten der in vivo Hydroxylierung von E_2-6,7-T zusammengefaßt.

	E_2-2,4,6,7-T		E_2-6,7-T	
	vorbeh.	unvorb. (K)	vorbeh.	unvorb. (K)
♀	34 %	30 %	19 %	4,0 %
♂	16 %	14 %	10 %	2,5 %
♀	+Barb.: 21 %	+Cyp.: 9,2 %		
		+Met.: 7,8 %		

Tabelle 4

In vivo Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T und E_2-6,7-T

Die Werte wurden mit Hilfe der Radiospirometrie ermittelt und stellen den prozentualen Anteil an HTO im Körperwasser, gemessen an der eingesetzten Tritiumgesamtaktivität nach 4,5 Stunden, dar.

appl. Hemmstoffmenge: Cyproteronacetat 6 mg/kg
Metopiron 6 mg/kg
Phenobarbital 40 mg/kg

Wie erwartet und in den in vitro Versuchen schon bestätigt, liegt auch hier die HTO-Bildung bei Einsatz von E_2-2,4,6,7-T wesentlich höher als bei E_2-6,7-T. Der Anstieg nach Barbiturat-Vorbehandlung ist dagegen geringer, weil schon bei den Kontrolltieren eine stärkere Hydroxylierungsrate vorliegt.
Ausführliche vergleichende Betrachtungen über die Hydroxylierungen in vivo zu in vitro werden in der Diskussion durchgeführt.

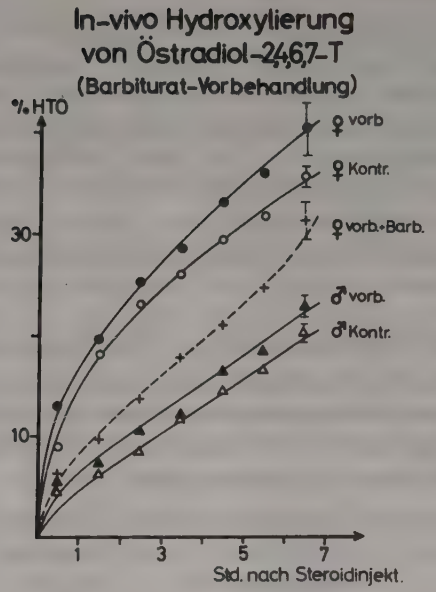


Abbildung 16

HTO-Bildung in Rattenmännchen und -weibchen nach Injektion von E_2-2,4,6,7-T mit und ohne Barbiturat-Vorbehandlung

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der Hydroxylierung an C-Atom 2, 4 und 6 (an C-Atom 7 findet keine statt)

Barbiturat-Vorbehandlung und Radiospirometrie wie bei Abbildung 14

i.p. Injektion des in Äthanol gelösten Steroids: 4,92 µCi ≙ 3,3 γ/Ratte spez.Akt. 400 µCi/µMol

gestrichelte Linie: am 5. Tag zusätzliche Barbituratgabe (40 mg/kg)

Die in den 6,5 Stunden-Werten eingezeichneten Standardabweichungen betragen zahlenmäßig:

Kontr.	Männchen:	± 1,18
Kontr.	Weibchen:	± 0,94
Vorb.	Männchen:	± 1,06
Vorb.	Weibchen:	± 2,59
Vorb+Barb.	Weibchen:	± 2,08

n = jeweils 4

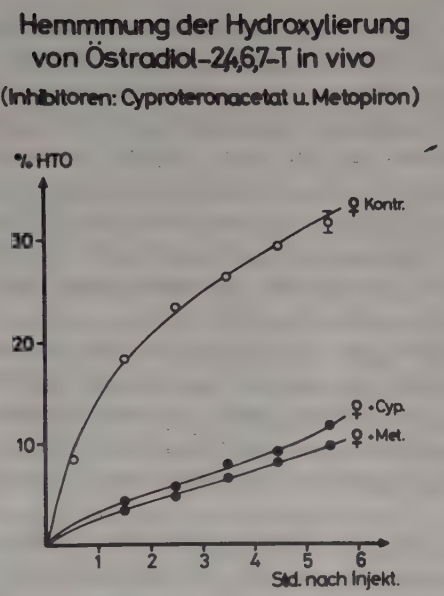


Abbildung 17

Hemmung der in vivo Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T durch Cyproteronacetat und Metopiron

(Versuchstiere: Rattenweibchen)

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser vorliegend, entsprechend der unter Abbildung 16 angegebenen Hydroxylierung

Steroidinjektion wie bei Abbildung 16

Injektion von Cyproteronacetat bzw. Metopiron: gleichzeitig zur Steroidinjektion; jeweils 6 mg/kg

Radiospirometrie: HTO-Werte 1,5 bis 4,5 Stunden nach Steroid- und Hemmstoffinjektion

n = 2

6. Diskussion

Das Auftreten von HTO im Atemwasser nach Injektion Tritium-markierter Steroide, sowie die Bildung von HTO in vitro bei Inkubationen von Lebermikrosomen mit Tritium-markierten Steroiden in Anwesenheit von NADPH und Sauerstoff, erklären wir uns durch Hydroxylierungsvorgänge, entsprechend dem in der Einführung dargestellten Reaktionsscheme. Zugrunde liegt das Prinzip der "Stoffwechsel-labilen" Tritium-Markierung (67), das ursprünglich von Wenzel und Mitarbeitern zur Bestimmung der Östradiol-Oxydation entwickelt wurde (66).
Man beachte aber, daß die HTO-Bildung nur Hydroxylierungen an dem C-Atom des betreffenden Moleküls anzeigt, welches das Tritium-Atom trägt. Hydroxylierungen an nicht Tritium-markierten Stellen des Moleküls sind dieser Spezifität wegen durch HTO-Bestimmungen nicht nachweisbar.
Bisher sind noch keine Beweise für die Richtigkeit dieser Annahme erbracht, daß die HTO-Bildung ein Maß der Hydroxylierung darstellt. Aus diesem Grund steht diese Beweisführung, deren Prinzip unter Punkt 3.2 beschrieben ist, am Anfang der vorliegenden Arbeit.
Es sei an dieser Stelle noch einmal betont, daß infolge nachstehend aufgeführter Gründe ausschließlich die Parallelität des unter den verschiedenen Versuchsbedingungen gemessenen HTO und 6-Hydroxy-E_2-^{14}C zueinander von Wichtigkeit ist und daß der zahlenmäßigen Übereinstimmung der gefundenen Werte keinerlei Bedeutung beigemessen werden kann.
Beim Einsatz von E_2-6,7-T wird bei der Messung von HTO neben der Hydroxylierung an C-Atom 6 eine eventuell an C-Atom 7 stattfindende miterfaßt.
Wird dagegen nach Inkubation mit E_2-^{14}C die Ausbeute an 6-Hydroxy-E_2-^{14}C bestimmt, muß berücksichtigt werden, daß ein konstanter Teil dieses Primärmetaboliten durch

mögliche zusätzliche Hydroxylierung an anderen Positionen oder durch schnelle Sekundärreaktionen der chromatographischen Bestimmung entgehen kann.
Nach King (36) greift zum Beispiel die 2-Hydroxylierung auch bereits an C-16 hydroxylierte Östrogene an und ähnliches darf nach Hecker und Marks (30) auch für 6-Hydroxy-Östrogene angenommen werden.
Lebermikrosomen enthalten neben den hydroxylierenden auch dehydrierende Aktivitäten (6). Somit sind für die meisten der in der Leber gebildeten Hydroxy-Steroide die entsprechenden Dehydrierungsprodukte bekannt. Hecker und Marks (30) stellten bei der Inkubation von Östron mit Rattenlebermikrosomen fest, daß als Folgeprodukt des entstandenen 6-Hydroxy-E_1 in erster Linie die entsprechende Oxoverbindung nachgewiesen werden konnte. Da an 6-Hydroxy-Östrogenen nicht nur die mikrosomale 6-Hydroxy-Steroid-Oxydoreduktase sondern auch die 17ß-Hydroxy-Steroid-Oxydoreduktase angreift (7), könnte man auch bei Einsatz von Östradiol neben der Bildung von 6-Hydroxy-E_2 und 6-Oxo-E_2 mit einer gewissen Menge 6-Hydroxy-E_1 sowie 6-Oxo-E_1 rechnen.
Die weitere Oxydation der primären Metaboliten des Östradiols, wie 2-Hydroxy-E_2 und 6-Hydroxy-E_2, kann schließlich zu hydrophilen Produkten führen (29), die beim Ausschütteln des Inkubationsansatzes mit Chloroform in der wässrigen Phase verbleiben. Um Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob die Einführung einer Hydroxylgruppe in Östron bzw. Östradiol die Bildung wasserlöslicher Metaboliten beschleunigt, inkubierten Lehmann und Breuer (42) 6α, 6ß und 7α-Hydroxy-E_2(Trihydroxyverbindungen), 6α, 6ß und 7α-Hydroxy-E_1 (Dihydroxyverbindungen) sowie zum Vergleich Östron (Monohydroxyverbindungen)mit Rattenlebermikrosomen. Es zeigte sich, daß die tri- und dihydroxylierten Verbindungen schneller zu wasserlöslichen Metaboliten umgewandelt werden.

Die hydroxylierten Metaboliten des Östradiol gehen zum Teil auch eine Proteinbindung ein, wobei sowohl an der Bildung der hydroxylierten Metaboliten als auch an der Proteinbindung ein und dasselbe NADPH-abhängige Enzymsystem beteiligt ist (27). Dieser Einfluß der Hydroxylasen auf die Proteinbindungsreaktion wurde vielfach beobachtet, insbesondere bei den Cancerogenen (48).

Bei den, im Rahmen der oben besprochenen Beweisführung erfolgten, parallelen Hydroxylierungen von E_2-6,7-T und E_2-^{14}C unter aeroben und anaeroben Bedingungen sowie unter Sauerstoffsättigung, wurden im Rahmen der Fehlerbreite gleiche Mengen HTO bzw. 6-Hydroxy-E_2-^{14}C gefunden (siehe Tabelle 2). Zur besseren Meßbarkeit wurde die Bildung dieser Hydroxylierungsprodukte durch Induktion der Hydroxylasen mit Phenobarbital erhöht.
Die unter aeroben Bedingugen gemessenen Werte von 2,21 % HTO (= $8{,}23 \cdot 10^{-7}$/uMol/mg Lebermikrosomen/Min) und 1,80 % 6-Hydroxy-E_2-^{14}C verdoppelten sich etwa in Sauerstoffatmosphäre und sanken unter anaeroben Verhältnissen auf nahezu 0,1 % ab. Die geringe, noch verbleibende Umsetzung ist wahrscheinlich auf einen, trotz anaerober Vorinkubation, nicht vollständig entfernbaren Rest Sauerstoff zurückzuführen.
Wurden unter aeroben Bedingungen den Inkubationsansätzen Metopiron oder Cyproteronacetat als Hemmstoff zugesetzt, so erhielt man um den gleichen Betrag herabgesetzte Ausbeuten an HTO bzw. 6-Hydroxy-E_2-^{14}C, wobei die Hemmung unter Metopiron stärker war.
Inkubationen mit E_2-2,4,6,7-T unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (Abbildung 4) ergaben ebenfalls bei Sauerstoffzufuhr die höchste Hydroxylierungsrate (23,4 %). Aerob werden 17,8 % (= $1{,}33 \cdot 10^{-6}$/uMol/mg Lebermikrosomen/Min), anaerob 0,3 % HTO gebildet. Bei nachfolgenden Untersuchungen war der Rückgang der HTO-Bildung unter anaeroben Bedingungen geringer (72).

Die im Vergleich zu E_2-6,7-T wesentlich höhere Ausbeute an HTO ergibt sich aus der zusätzlich erfaßten Hydroxylierung an Position 2 und 4. Bekannt ist, daß die 2-Hydroxylierungsprodukte bei der Östrogeninaktivierung dominieren (25, 29, 36), was auch in den anschließend diskutierten in vivo Versuchen die hohe HTO-Bildung nach Injektion von E_2-2,4,6,7-T selbst ohne Barbiturat-Vorbehandlung erklärt. An C-Atom 4 werden Östrogene durch Rattenlebermikrosomen nur in sehr geringen Mengen hydroxyliert (25).
Der im Vergleich zu den Ergebnissen mit E_2-6,7-T gering erscheinende HTO-Anstieg unter Sauerstoffatmosphäre ist durch die große Basishydroxylierung an C-Atom 2, schon unter aeroben Bedingungen, zu verstehen. Wie die in vivo Versuche zeigen, ist auch der Anstieg nach vorherigen Barbituratgaben relativ geringer als bei E_2-6,7-T.
Die Untersuchungen über Gewebsabhängigkeit und Enzymkinetik beweisen eindeutig, daß Enzyme oder Enzymsysteme vorhanden sind, die sich an der untersuchten Hydroxylierungsreaktion beteiligen. Das pH-Optimum liegt bei 7,4 (siehe Abbildung 7), was dem Gewebs-pH entspricht. Bei steigender Enzymmenge steigt der Substratumsatz linear (Abbildung 5).
Aus der Abhängigkeit des Umsatzes von der Konzentration der eingesetzten Steroide wurden nach Lineweaver-Burk die K_m-Werte ermittelt. Sie sind in nachstehender Tabelle zusammen mit den von Kuntzmann und Mitarbeitern (38) aufgeführt. Dabei ist für E_2-2,4,6,7-T zu bemerken, daß der K_m-Wert die Hydroxylierung an C-Atom 2 repräsentiert. Die HTO-Bildung durch Umsetzung an C-6 und C-7 ist hier zu vernachlässigen, da sie nur etwa ein Zehntel der Ausbeute ausmacht. Auch an C-4 findet nur eine minimale Hydroxylierung statt (25).

Bei E_2-6,7-T wird ein Überwiegen der Hydroxylierung an C-6 gegenüber der an C-7 angenommen (7, 9, 49), was analog dazu auch bei Äthinyl-E_2-6,7-T erwartet werden kann.

Substrat	Berechnet als Hydroxylierung an C-Atom	K_m-Werte (Mol/l) diese Arbeit	K_m-Werte (Mol/l) Kuntzmann u. Mitarb. (22)	V_{max}-Werte (Mol/l·min)
E_2-6,7-T	6	$1,4 \cdot 10^{-5}$	--	$2,2 \cdot 10^{-8}$
E_2-2,4,6,7-T	2	$1,8 \cdot 10^{-5}$	--	$2,0 \cdot 10^{-7}$
E_2	siehe Legende	--	$4,9 \cdot 10^{-5}$	--
Äthinyl-E_2-T	6	$1,1 \cdot 10^{-5}$	--	$7,7 \cdot 10^{-9}$
Äthinyl-nortestosteron-acetat-7-T	7	$2,5 \cdot 10^{-5}$	--	$1,5 \cdot 10^{-8}$
Progesteron	siehe Legende	--	$1,6 \cdot 10^{-5}$	--
Testosteron	siehe Legende	--	$2,6 \cdot 10^{-5}$	

Tabelle 5
Zusammenstellung von K_m- und V_{max}-Werten für die Hydroxylierung verschiedener Substrate
Die aus der Literatur angegebenen Werte stellen nach Ausführung der Autoren den Mittelwert aus der Bildung sämtlicher bei dem jeweiligen Steroid vorkommenden Hydroxylierungsprodukte dar, da sämtliche polaren Reaktionsprodukte gemeinsam papierchromatographisch isoliert wurden. Da aus technischen Gründen kein hochgereinigtes hydroxylierendes System hergestellt werden kann, könnten die K_m-Werte dieser Arbeit durch unspezifische Bindungen und durch den Transport der Steroide zu den Enzymen dahingehend beeinflußt sein, daß sie etwas zu hoch gemessen wurden (19).

Wie schon andere Autoren vermuten (64), scheinen die oxydativen Arzneimittel-metabolisierenden Enzyme Steroide als natürliche, körpereigene Substrate zu haben, wobei auch die synthetischen Steroide Äthinyl-Östradiol und Äthinyl-nor-testosteron-acetat nicht ausgenommen sind. Die K_m-Werte für die Hydroxylierung der untersuchten Steroidhormone sind nämlich über das Zehnfache niedriger als die K_m-Werte für den Metabolismus etlicher Arzneimittel. So beträgt zum Beispiel nach Rubin und Mitarbeitern (56) der K_m-Wert für Pentobarbital $2{,}2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, für Hexobarbital $1{,}2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, für Chlorpromazin $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und für Äthylmorphin $5{,}8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß die K_m-Werte (der Δ^4-Reduktase) für die Reduktion des Ringes A von Δ^4-3-Ketosteroiden durch die in Lebermikrosomen enthaltenen Enzyme, die wie die Hydroxylierung einen Inaktivierungsschritt darstellt, in der gleichen Größenordnung liegen, wie die in der vorliegenden Arbei gefundenen für Steroid-Hydroxylierungen (46, 24, 59).

Die gleichzeitig mit den Untersuchungen zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten ermittelte Hydroxylierung unter Zusatz von Caproteronacetat bzw. Metopiron ergab aus den jeweiligen Kurvenverläufen der Lineweaver-Burk-Diagramme, daß es sich bei beiden Substanzen um nicht kompetitive Inhibitoren handelt. Bei gleichen K_m-Werten änderte sich unter Hemmstoffzusatz nur die Steigung der Kurven. Die in Tabelle 3 zusammengestellten Inhibitor-Konstanten zeigen, daß die Bindung von Metopiron an die Hydroxylasen in allen Fällen stärker war. Somit ist die größere Hemmwirkung von Metopiron gegenüber Cyproteronacetat erklärt.

Die unter Punkt 5.1 beschriebene in vivo Methode, die Radiospirometrie, deren Ergebnisse, nach den am Anfang dieser Arbeit erzielten Beweisen, eindeutig zur Messung der Hydroxylierung herangezogen werden können, wurde aus speziellem Interesse bei zwei, in Ovulationshemmern häufig enthaltenen Steroiden, dem Östrogen Äthinyl-E_2 und dem Gestagen Äthinyl-nor-testosteron-acetat, angewandt, um den Einfluß einer Barbiturat-Vorbehandlung auf den inaktivierenden Metabolismus zu ermitteln.

Die Kontrollversuche zeigten nur eine geringfügige HTO-Bildung nach Injektion von Äthinyl-E_2-6,7-T und Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T (0,8 %). Die Hydroxylierung an C-Atom 7 und/oder C-Atom 6 der injizierten Tritium-markierten Steroide war also sehr gering. Dagegen fand man nach Vorbehandlung mit Barbiturat einen deutlichen Anstieg der HTO-Bildung (2,8 bzw. 2,0 %). Bolt (4) konnte in dieser Arbeit nachfolgenden Untersuchungen mit Äthinyl-E_2-6,7-T das für dieses Steroid hier vorliegende Ergebnis bestätigen. Da die hydroxylierten Hormone fast keine biologische Aktivität mehr besitzen, bewirkt also die Induktion von Hydroxylasen eine erhöhte irreversible Inaktivierung dieser Steroide. Jedoch ist das absolute Ausmaß dieser biologischen Inaktivierung hier unbedeutend. Es sei aber betont, daß wir bei den beiden Indikatorsteroiden eine stärkere Hydroxylierung an anderen Stellen des Steroidgerüstes (8) unserer Methode wegen nicht erfassen. Bolt (4), der in nachfolgenden in vivo und in vitro Versuchen neben Äthinyl-E_2-6,7-T auch das Äthinyl-E_2-2,4,6,7-T einsetzte, stellte fest, daß Äthinylöstradiol wie Östradiol bevorzugt an C-2 hydroxyliert wird. Auch hier ist die Inaktivierung durch Hydroxylierung etwa zehnmal größer als an C-6 und C-7.

Bei Injektion von E_2-2,4,6,7-T betrug die HTO-Bildung nach Vorbehandlung mit Barbiturat, innerhalb von 4,5 Stunden bei Rattenmännchen 16 % und bei den Weibchen 34 %, wobei die Werte ohne Vorbehandlung (Kontrollwerte) nur 2 % bzw. 4 % niedriger lagen. Die wahrscheinliche Ursache dafür wurde oben bereits diskutiert.

Wie bei den von Conney ausgeführten in vitro Untersuchungen (11), zeigt auch diese Methode in vivo, daß die induzierten Hydroxylasen erst nach einer gewissen Inkubationszeit nach Barbituratgabe nachweisbar sind. Ebenfalls wie bei Conney (11), sowie bei den eigenen hier durchgeführten in vitro Untersuchungen, werden einmal durch Barbiturat induzierte Hydroxylasen durch nochmalige Barbituratgabe gehemmt (vergl. Tabelle 2, Abbildungen 13 und 16). Das läßt sich dadurch erklären, daß Steroid und Barbiturat um die Hydroxylasen konkurrieren (11). Diese Konkurrenz findet nicht nur um die induzierten, sondern auch um die bereits vorher vorhandenen Hydroxylasen statt, wie das Absinken der HTO-Werte unter die Kontrollwerte bei der Durchführung des Versuches mit E_2-2,4,6,7-T zeigt.
Bei vergleichenden Betrachtungen der Versuchsergebnisse in vitro zu in vivo finden wir durchweg gute Übereinstimmung. Die Steigerung der Hydroxylierungsrate nach Barbiturat-Vorbehandlung zeigt sich gleichermaßen in vivo wie in vitro (vergl. Abbildungen 10 und 16). Äthinyl-E_2-6,7-T wird nach Vorbehandlung in vivo wie in vitro in Rattenweibchen stärker hydroxyliert als in Männchen. Bei Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T verhält es sich genau umgekehrt. Bei der Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T werden sowohl in vivo als auch in vitro wesentlich größere Mengen HTO gebildet als bei der Hydroxylierung von E_2-6,7-T. Auch die nach Conney (11) kompetitive Hemmung durch Phenobarbital sowie die als

nicht kompetitive nachgewiesene Hemmung durch Cyproteronacetat und Metopiron zeigt diese Parallelität.

Diese Ergebnisse bekräftigen noch einmal die Tatsache, daß der in vitro geführte Beweis (HTO-Bildung = Maß der Hydroxylierung) ohne weiteres auf in vivo Versuche übertragbar ist und dort nicht etwa in vitro nicht erfaßte Stoffwechselvorgänge die HTO-Bildung verändern.

Bei Betrachtung der Absolutumsätze muß natürlich der Isotopieeffekt berücksichtigt werden, der zu einem verlangsamten Umsatz des Tritium-markierten Steroids gegenüber dem nicht markierten Steroid führen kann. Man kann somit erwarten, daß nur Mindestwerte der Hydroxylierung bei der HTO-Messung erhalten werden. Hinzu kommt bei den in vivo Versuchen, daß hier stets der Umsatz von Tritium-markierten Steroiden untereinander verglichen wird, und auch in vitro würde sich ein stets gleicher Faktor bei den HTO-Werten nicht auf die Versuchsergebnisse auswirken.
Wenn wir annehmen, daß bei der Herstellung des E_2-6,7-T, E_2-2,4,6,7-T, Äthinyl-E_2-6,7-T bzw. Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T keine der möglichen stereoisomeren Formen bevorzugt wird, sondern diese mit statistischer Wahrscheinlichkeit auftreten, so müssen wir bei Einsatz dieser Tritium-markierten Steroide damit rechnen, daß bei der Hydroxylierung nicht jeden Steroidmoleküls ein Tritium-Atom im Wasser erscheint. Das bedeutet: Das Ausmaß der Hydroxylierung an der jeweilig markierten Stellung kann größer sein, als es bei den vorgenommenen Untersuchungen nachweisbar ist.
In vitro Versuche von Breuer und Mitarbeitern (7) mit Rattenleber haben gezeigt, daß beim Östradiol sowohl eine Hydroxylierung in 6α- als auch in 6β-Position möglich ist.

Der Befund einiger Autoren, erwachsene männliche Ratten verfügten über einen höheren Hydroxylasen-Spiegel als weibliche (38, 46), kann durch die vorliegenden Versuchsergebnisse nicht bestätigt werden. Nur die Hydroxylierung von Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T ergibt bei Männchen höhere Werte.
Wie andere Untersuchungen gezeigt haben, ist die Analyse von Körperwasserproben beim Menschen durch Destillation von Harn- oder Blutproben ohne Schwierigkeiten möglich (69). Daher ist das hier aufgezeigte Verfahren auch in der Humanmedizin anwendbar, wo seine Vorteile besonders deutlich und Untersuchungen über die gegenseitige Beeinflussung von Arzneimitteln besonders wichtig sind.
Bereits erfolgte Untersuchungen zeigen auch dort, daß die Hydroxylierung an C-Atom 6 und/oder 7 bei E_2 wesentlich stärker durch Medikamente induziert werden kann als bei Äthinyl-E_2 (70).

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit erbringt durch parallele Inkubationen von E_2-^{14}C und E_2-6,7-T mit Rattenlebermikrosomen unter verschiedenen Bedingungen (aeroab; anaerob; unter reinem Sauerstoff; bei Hemmstoffzusatz) den Beweis, daß die HTO-Bildung ein Maß für die Hydroxylierung ist.
Es ergaben sich bei diesen Versuchen prozentual etwa gleiche und wie gefordert, sich parallel verhaltende Ausbeuten an 6-Hydroxy-E_2-^{14}C bzw. HTO, die, wie bei der sauerstoffabhängigen enzymatischen Hydroxylierung erwartet, unter anaeroben Bedingungen nahezu Null waren und sich bei Zufuhr reinen Sauerstoffs, gegenüber den unter Luftzufuhr (1,80 bzw. 2,21 %) etwa verdoppelten. Cyproteronacetat und Metopiron senkten die Hydroxy-

lierungsrate (Cyproteronacetat bei der Konzentration von 0,06 mg/Ansatz auf 0,90 % bzw. 0,82 %, Metopiron bei der gleichen Konzentration auf jeweils 0,34 %).

Die Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T unter den verschiedenen Versuchsbedingungen verhielt sich gleichartig (anaerob 0,3 %(siehe Diskussion); aerob 17,8 %; unter Sauerstoff 23,4 %), nur bekamen wir hier, gemäß der zusätzlich erfaßten Umsetzung am C-Atom 2 und 4, höhere Ausbeuten.
Die enzymkinetischen Untersuchungen der Hydroxylierung ergaben folgende K_m-Werte: $1,4 \cdot 10^{-5}$Mol/l für E_2-6,7-T; $1,8 \cdot 10^{-5}$Mol/l für E_2-2,4,6,7-T; $1,1 \cdot 10^{-5}$Mol/l für Äthinyl-E_2-6,7-T; $2,5 \cdot 10^{-5}$Mol/l für Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T. Unter Zusatz von Cyproteronacetat oder Metopiron ließen sich die unter Punkt 4,3,5 zusammengestellten Inhibitorkonstanten ermitteln. Beide Substanzen erwiesen sich als nichtkompetitive Inhibitoren, wobei Metopiron stärker wirksam war.

Die Inaktivierung der beiden ovulationshemmenden Steroide Äthinyl-E_2-6,7-T und Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T durch Barbiturat-induzierte Hydroxylierung wurde in vivo radiospirometrisch gemessen. Nach Injektion beider Steroide fand sich bei männlichen und weiblichen Ratten nur ein sehr geringer Anteil der injizierten Aktivität im Körperwasser der Tiere als Tritiumwasser (0,8 %). Die Vorbehandlung mit Phenobarbital steigerte diesen Wert. Interessanterweise zeigte sich aber nach Gabe von Äthinyl-E_2-6,7-T nur bei den Weibchen eine Wirkung (Steigerung der HTO-Bildung auf 2,8 %), nach Gabe von Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T nur bei Männchen (Steigerung auf 2,0 %).
Die in vivo Hydroxylierung von E_2-2,4,6,7-T ergab schon ohne Vorbehandlung mit Barbiturat eine hohe HTO-

Bildung (Männchen: 14 %, Weibchen: 30%), die nach Vorbehandlung stieg (Männchen: 16 %, Weibchen: 34 %) und unter gleichzeitig mit dem Steroid injizierten Hemmstoffen (6 mg/kg) sank (Weibchen: unter Cyproteronacetat 9,2 %, unter Metopiron 7,8 %).
In vivo wie in vitro vergleichbar durchgeführte Versuche zeigten gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

8. Material und Methodik

8.1 Material

Versuchstiere

Es wurden männliche und weibliche Wistarratten eigener Zucht verwendet. Die Gewichte lagen zwischen 150 und 280 g. Die Tiere erhielten "Altromin" Standardfutter und Wasser ad libitum.

Steroide

Sämtliche in der Arbeit verwendeten Steroide wurden dünnschichtchromatographisch auf chemische und radiochemische Reinheit geprüft.

a) inaktive Steroide:

Östradiol (E_2)	Fa. Merck, Darmstadt
Östron (E_1)	" "
Östriol (E_3)	" "
6α-Hydroxy-E_2	Fa. Ikapharm Ltd.,Ramat-Gan
6-Hydroxy-E_2-triacetat	Fa. Schering AG, Berlin
Äthinyl-E_2	" "
Äthinyl-nor-testosteron-acetat	" "

b) Tritium- und ^{14}C-markierte Steroide:

E_2-6,7-T	Fa. Buchler, Braunschweig
spez. Akt.: 39,7 mCi/μMol	
E_2-4-^{14}C	" "
spez. Akt.: 43,2 μCi/μMol	
E_2-2,4,6,7-T	Fa. NEN, Dreieichenhain bei Frankfurt
spez. Akt.: 110 mCi/μMol	
Äthinyl-E_2-6,7-T	Fa. Schering AG, Berlin
spez. Akt.: 500 μCi/μMol	
Äthinyl-nor-testosteron-acetat-7-T	" "
spez. Akt.: 780 μCi/μMol	

Barbiturat

Na-Salz der Phenyläthylbarbitursäure; Fa. Merck, Darmstadt

Hydroxylierungshemmstoffe

Metopiron = 2-Methyl-1,2-dipyridyl-(3')-1-oxo-propan; Fa. Ciba AG, Wehr (Baden)
Cyproteronacetat = 6-Chlor-3,20-dioxo-1α,2α-methylen-pregnandien-(4,6)-yl-(17α)-acetat; Fa. Schering AG, Berlin

Reagentien, Lösungsmittel und Enzyme

Alle Reagentien hatten den Reinheitsgrad "pro analysi". Die Szintillationschemikalien waren Originalsubstanzen der Fa. Beckmann Inc.
Das NADPH stammte von der Fa. C.F. Boeringer, Mannheim

8.2 Methodik

Vorbehandlung

Die mit Phenobarbital-Na vorbehandelten Tiere erhielten drei Tage zweimal täglich 40 mg/kg des Barbiturats, jeweils in 0,2 ml physiolog. Kochsalzlösung gelöst, i.p. injiziert

Inkubationen und Aufarbeitung der Ansätze

Gewinnung der Lebermikrosomen

Die Tiere wurden in Äthernarkose getötet. Nach dem Ausbluten wurde die Leber entnommen und sofort in eisgekühlte Tris-HCl-Pufferlösung gebracht. 7 g Lebergewebe wurden mit der Schere zerkleinert und mit 10 ml Tris-HCl-Puffer im Potter-Homogenisator bei 200 UpM unter Eiskühlung homogenisiert.
Das Homogenisat wurde zuerst 10 Min. bei 10 000 UpM zentrifugiert. Dabei warden größere Zellfragmente abgetrennt. Anschließend wurde 60 Min. bei 40 000 UpM

zentrifugiert und die dabei sedimentierten Mikrosomen zweimal mit je 10 ml Tris-HCl-Puffer gewaschen, indem jeweils nach Abgießen des Überstandes und erneutem Homogenisieren mit Puffer 30 Min. bei 40 000 UpM zentrifugiert wurde. Zum Schluß wurden die Mikrosomen nochmals mit soviel Puffer homogenisiert, daß 10 ml Mikrosomensuspension resultierten.
Sämtliche Arbeitsgänge wurden bei 0°C durchgeführt. Die Zeit zwischen dem Töten der Tiere und dem Inkubationsbeginn betrug nicht mehr als 3 Stunden.

Inkubationsansätze

0,1 ml aktives Steroid in Äthanol bzw. Propylenglykoll gelöst
2,5 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) mit Zusatz von 0,5 mg NADPH (27 /uMol/l)
0,4 ml Mikrosomensuspension (entsprechend 280 mg Lebergewebe)

Die Inkubationen wurden im Warburg'schen Schüttelthermostaten bei 37°C unter Luftzutritt durchgeführt. Für die Versuche zu Punkt 3,3 wurde auch anaeroben Bedingungen (95 % N_2/ 5 % CO_2) oder Sauerstoffsättigung inkubiert. Dabei wurde das Substrat aus einem Seitenarm erst eingeschwenkt, nachdem diese Bedingungen hergestellt waren. Die Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach 15 Min. durch sofortige Kühlung in Eiswasser unterbrochen.

Aufarbeitung der Versuchsansätze

HTO-Bestimmung
Ca. 1,3 ml des Inkubationsgemisches wurden nach vollendeter Reaktion einer Gefrierdestillation unterzogen und 1 ml Destillat der Flüssig-Szintillationsmessung zugeführt.

Bestimmung von 6-Hydroxy-E_2

Die Inkubationsansätze wurden in Zentrifugengläser gefüllt, mit ca. 3 ml Chloroform nachgespült und geschüttelt. Dann wurde 5 Min. bei 3000 UpM zentrifugiert und das Chloroform mit einer Pipette vom Boden abgesaugt. Spülen und Extrahieren wurde dreimal wiederholt.
Die Chloroformextrakte wurden vereinigt und im Druckluftstrom bei leichter Erwärmung auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft.
Die Weiterverarbeitung, d.h. Isolierung von 6-Hydroxy-E_2, ist unter Punkt 3.2 beschrieben. Die hier entwikkelten Radiochromatogramme wurden mit einem "Dünnschicht-Scanner" der Fa. Berthold, Wildbad, in Kombination mit einem Punktdrucker (71) gemessen (unter Punkt 3.2.1 Vergleich dieser Methode zur Autoradiographie).

Mikrochemische Acetylierung von 6-Hydroxy-E_2

Das vom Dünnschichtchromatogramm eluierte Steroid wurde in 0,2 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 0,1 ml Acetanhydrid versetzt. Anschließend wurde 2 Stunden auf 80°C erwärmt.
Die erhaltenen Produkte wurden dünnschichtchromatographisch gereinigt und mit Hilfe der Referenzsubstanzen identifiziert.

Radioaktivitätsmessung

Das Tritiumwasser sowie das aktive, von der DC-Platte abgeschabte Steroid in Kieselgel wurden mit Hilfe von Dioxan-Szintillationslösungen (2,5-Diphenyloxazol 5,0 g, Naphthalin 100,0 g, Dioxan ad 1 Liter) in einem Flüssig-Szintillationsmeßgerät Modell CS 150 der Fa. Beckmann gemessen.
Die Zählausbeute im Tritium- und ^{14}C-Kanal wurde durch externen Standard bestimmt, bei Messungen mit Kieselgel unter Zusatz von internem Standard.

Radiospirometrie

Das Prinzip dieser Methode wird unter Punkt 5.1 besprochen.

Versuchsanordnung

Die in 0,2 ml Äthanol gelösten aktiven Steroide wurden jeweils 2 Tieren i.p. injiziert. Dabei erhielt jedes Tier 3-6 /ug mit je 5-25 /uCi. Sie wurden sofort in einen speziellen, zylindrischen Plexiglaskäfig (Fa. Witels, Berlin) gesetzt, der mit conc. H_2SO_4, $CaCl_2$ und KOH getrockneter Luft ständig durchströmt wurde. Das von den Tieren in Atemluft und Urin abgegebene Wasser gelangte als Wasserdampf in eine mit flüssiger Luft gekühlte Kühlfalle und fror dort aus. Die Kühlfallen wurden alle Stunde gewechselt. Sie enthielten durchschnittlich 1 ml Wasser. Aus den Wasserproben wurde direkt die Aktivität in /uCi T/ml gemessen (=HTO).

Die Hydroxylierung wird nach folgender Formel berechnet:

$$100 \cdot \frac{/\text{uCi/ml Körperwasserdestillat}}{/\text{uCi inj. Steroid/ml Körperwasser}} = \text{Mendest-Hydroxylierung in \%}$$

Das Gesamtkörperwasser läßt sich aus dem Gewicht der Tiere berechnen. Es beträgt nach Paze und Rarthburn 64 - 68 % (53).

9. Literaturverzeichnis

1) M.T. Abdel-Aziz u. K.J.H. Williams; Steroids 13, 809 (1969)

2) M.T. Abdel-Aziz u. K.J.H. Williams; Steroids 15, 695 (1970)

3) D.L. Berliner, G.F. Leong, D.M. Cazes u. M.L. Berliner; Amer. J. Physiol. 202, 420 (1962)

4) H.M. Bolt; Xenobiotica 3, 773 (1973)

5) H. Breuer, U. Dardenne u. W. Nocke; Acta Endocrinol. 33, 10 (1960)

6) H. Breuer u. R. Knuppen; Biochim. et Biophys.Acta 39, 408 (1960)

7) H. Breuer, R. Knuppen u. G. Pangels; Biochim. et Biophys. Acta 65, 1 (1962)

8) H. Breuer, R. Knuppen u. M. Haupt; Nature 212, 5057 (1966)

9) H. Breuer, L. Nocke u. R. Knuppen; Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 315, 72 (1959)

10) S.C. Brooks, L. Horn u. J.P. Herwitz; Biochem. et Biophys. Acta 104, 52 (1963)

11) A. Conney; Pharmacol. Rev., Baltimore, 19,317(1967)

12) A. Conney u. A. Klutsch; J. biol. Chemistry 238, 1611 (1963)

13) H. Engel, B. Bagget u. P. Carter; Endocrinol. 61, 113 (1957)

14) J. Fishman, H.L. Bradlow u. T.F. Gallagher; J. biol. Chemistry 235, 3104 (1960)

15) J. Fishman u. T.F. Gallagher; Arch. Biochem. 77, 511 (1958)

16) K. Fotherby u. F. James; Steroid Biochemistry and Pharmacology 3, 71 (1972)

17) K. Fotherby, S. Kamyab, P. Littleton u. A.Klopper; Biochem. J. 99, 14 (1966)

18) V.A. Frandsen; Acta Endocrinol. 31, 603 (1959)

19) J.R. Gilette; Prog. Drug Res. 6, 11 (1963)

20) G. Guroff, J.W. Daly, D.M. Jerina, J. Renson, B. Wittrop u. S. Udenfried; Science 157, 1524(1967)

21) H. Greim; Dtsch. med. Wschr. 95, 2196 (1970)

22) K. Griffiths; J. Endocr. 26, 445 (1963)

23) J.S. McGuire jr. u. G.M. Tomkins;
J. of Biol. Chem. 235, 1634 (1960)

24) J.S. McGuire jr., V.W. Hallis jr. u.G.M. Tomkins;
J. of Biol. Chem. 235, 3112 (1960)

25) E. Hecker u. F. Marks; Biochem.Z. 343, 211 (1965)

26) E. Hecker u. G.C. Mueller;
J. biol. Chemistry 233, 991 (1958)

27) E. Hecker u. G. Nowoczek;
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 337, 257 (1964)

28) E. Hecker u. D. Betz;
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 338, 260 (1964)

29) E. Hecker u. S. Zayed;
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 325, 209 (1961)

30) E. Hecker u. F. Marks; Biochem. Z. 343, 211(1965)

31) W. Hoffmann, H. Breuer u. F. Neumann;
Arzneimittel-Forsch. 18, 586 (1968)

32) P.H. Jellinck; Biochem. J. 58, 262 (1954)

33) J.S. Jenkings, J.W. Meakin, D.H. Nelson u.
G.W. Thorn; Science 128, 478 (1958)

34) Jirkn u. M. Lewitz; J.Clin.Endocrinol. 29,615 (1969)

35) F.W. Kahnt u. R. Neher; Experentia 18,499 (1962)

36) R. King; Biochem. J. 79, 355 (1961)

37) J. Kraulis u. M.K. Birmingham; Fed.Proc. 22,530(1963)

38) R. Kuntzmann, M. Jacobson, K. Schneidmann u.
A. Conney; J. Pharmacol. 146, 280 (1964)

39) E. Kuss; Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 349,1234(1968)

40) D.S. Layne, T. Golab, K. Arai u. G. Pincus;
Biochem. Pharmacol. 12, 805 (1963)

41) H. Langecker; Acta Endocrinol. 37, 14 (1961)

42) W.D. Lehmann u. H. Breuer;
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 350, 191 (1969)

43) W.D. Lehmann u. H. Breuer;
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 348, 1633 (1967)

44) K. Leybold u. H. Staudinger;
Arch. Biochem. 96, 629 (1962)

45) K. Leybold u. H. Staudinger; Med.exp.Basel 2, 46(1960)

46) K. Leybold u. H. Staudinger; Biochem.Z. 331,399(1959)

47) B.P. Lisboa u. E. Diczfalusy;
Acta Endocrinol. 40, 60 (1962)

48) E.C. Miller u. J.A. Miller;
Annu Rev. Biochem. 28, 291 (1959)

49) G.C. Mueller u. G. Rumney;
J. Amer. Chem. Soc. 79, 1004 (1957)

50) S. Murata; Nippon Naipunpi,Gakkai Zasshi 43,1083(1968)

51) K.H. Palmer, F. Feierabend, B. Baggettu. M.E. Wall;
J. Pharmacol. and Exp. Ther. 167, 217 (1969)

52) G. Pangels u. H. Breuer;
Naturwissenschaften 49, 106 (1962)

53) N. Paze u. E. Rarthburn; J.biol.Chem. 158,667 (1945)

54) L.G.S. Rao u. W. Taylot; Biochem. J. 90, 30 (1964)

55) H. Remmer; Arch. internat.pharmacodyn.thérap.152,
346 (1964)

56) H. Remmer u. M. Siegert;
Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 247, 522 (1964)

57) A. Rubin, T.R. Tephly u.G.J. Mannering;
Biochem. Pharmacol. 13, 100 (1964)

58) H. Schriefers, W. Cremer u. M. Otto;
Z. Physiol. Chem. 348, 138 (1967)

59) H. Schriefers u. E. Waszmuth;
Z. Physiol. Chem. 338, 100 (1964)

60) W. Staib, K. Dönges u. W. Feller;
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 324, 32 (1961)

61) E.G. Steinetz, A. Meli u. V.L. Beach;
Intern. J. Fert. 12, 148 (1967)

62) G.M. Tomkins; J.of Biolog.Chem. 225, 13 (1957)

63) R.C. Troop; Endocrinology 64, 671 (1959)

64) R. Welch u. A.H. Conney;
Federation Proc. 24, 639 (1965)

65) M. Wenzel u. P.E. Schulze in:
Tritium-Markierung, Verlag W. de Gruyter & Co.

66) M. Wenzel, H. Kleucker u. P.E. Schulze;
Z. Naturforsch. 21b, 1178 (1966)

67) M. Wenzel; Prinzip der "Stoffwechsel-labilen"
Tritium-Markierung, Ber.d.Jahrestag., Ges.f.
Nuklearmed., Zürich, 1969, Schattauer Verlag

68) M. Wenzel, G. Köster, J. Hönicke;
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8, 231 (1970)

69) M. Wenzel u. K.U. Blum;
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 5, 202 (1967)

70) M. Wenzel u. H.J. Stahl;
Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 351, 761 (1970)

71) M. Wenzel u. K. Hoffmann;
Anal. Biochem. 44, 97 (1971)

72) M. Wenzel; eigene Mitt.

73) F.E. Yates, A.L. Herbst u. I. Urquart;
Endocrinology 63, 887 (1958)

74) G.K. Winkler u. R.A. Harkness;
Klin. Wschr. 42, 922 (1964)

Danksagung

Herrn Professor Dr. M. Wenzel sage ich Dank für die bei der vorliegenden Arbeit gewährte freundliche Unterstützung.

Der Firma Schering danke ich für die Überlassung der für die Untersuchungen notwendigen Substanzen.

Lebenslauf

Am 29.1.44	wurde ich als Tochter des Polizeihauptwachtmeisters Herbert Hönicke und seiner Ehefrau Elsbeth, geb. Gorgas, in Potsdam-Babelsberg geboren.
1.9.50-28.3.56	Besuch der Grundschule
1.4.56-31.3.60	Besuch eines neusprachlichen und mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums (Droste-Hülshoff-Schule, Berlin) bis zum erfolgreichen Abschluß der 10. Klasse
1.4.60-30.9.62	Ausbildung zur chem.-techn. Assistentin auf einer staatl. anerkannten Chemie-Fachschule (Liebig-Schule, Berlin) Gesamtabschlußnote "gut"
1.11.62-30.9.63	Tätigkeit als chem.-techn. Assistentin am Pharmakolog. Inst. der FU Berlin
1.10.63-30.9.67	am Pharmazeut. Inst. der FU Berlin
August 1964 bis 2.6.67	Besuch eines staatl. Abendgymnasiums (Peter-A.-Silbermann-Schule, Berlin) abgeschlossen mit dem Abitur
ab Wintersemester 67/68	Medizinstudium an der FU Berlin
10.8.73	Staatsexamen mit Gesamtnote "gut" bestanden
23.6.70	Eheschließung mit dem Pharmareferenten Lutz Glasberger
1.10.73-31.1.74	Medizinalassistentin auf der internistischen Abt. des St.Gertrauden-Krankenhauses, Berlin
1.2.74-31.5.74	Medizinalassistentin auf der chirurg. Abt. des St.Joseph Krankenhauses, Berlin
1.7.74-30.9.74	Medizinalassistentin auf einer psychiatrischen Station der neuropsychiatrischen Waldhausklinik, Berlin

seit 1.10.74	für einen Monat als Medizinalassistentin auf der Abt. für Anästhesie und Intensivpflege des St.Joseph Krankenhauses, Berlin
11.11.74	Erteilung der Approbation seitdem bis heute auf der gleichen Abteilung als Assistenzärztin beschäftigt.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198